

**Pharmakologische Untersuchungen von
Fusionsproteinen mit gerinnungs-
hemmenden und profibrinolytischen
Eigenschaften**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades**

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Christian Icke
geboren am 06.04.1973 in Erfurt

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. habil. Frank Große, Jena
2. Prof. Dr. med. habil. Rainer Klinger, Jena
3. Prof. Dr. med. habil. Erika Glusa, Erfurt

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01. Oktober 2002

Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
aPTT	Activated partial thromboplastin time
BIA	Biomolecular interaction analysis
DFP	Diisopropylfluorophosphat
Dip-I	Erste N-terminale Domäne des Dipetalins
Dip-II	Zweite N-terminale Dipetalin-Domäne
Dip-I+II	Dipetalin bestehend aus den beiden N-terminalen Domänen
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ExpASy	Expert protein analysis system
FPLC	Fast performance liquid chromatography
FXa	Aktivierter Gerinnungsfaktor X
H ₆ -Sak-IEGR	Staphylokinase mit 6 His-Resten in N-terminaler Position und den Aminosäuren Gln-Leu/Phe, gefolgt von der FXa-Schnittstelle (Ile-Glu-Gly-Arg) am C-Terminus
H ₆ -Sak-Dip-I	
H ₆ -Sak-Dip-II	
H ₆ -Sak-Dip-I+II	Fusionproteine aus H ₆ -Sak-IEGR und Dipetalin-Domänen
HPLC	High performance liquid chromatography
HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation
IEGR	Aminosäuresequenz Ile-Glu-Gly-Arg
IMB	Institut für Molekulare Biotechnologie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
K _i	Inhibitionskonstante
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser-desorption ionization – time of flight
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriazetat
NO	Stickstoffmonoxid
o.g.	oben genannt
p.a.	pro analysi

PAR	Protease activated receptor
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
Plg	Plasminogen
PMSF	Polymethylsulfonylfluorid
PPP	Platelet-poor plasma
PRP	Platelet-rich plasma
PT	Prothrombin time
PVDF	Polyvinylidendifluorid
QL/F	Aminosäuresequenz Gln-Leu/Phe
RGD	Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp
S-2238	synthetisches chromogenes Substrat für Thrombin
S-2251	synthetisches chromogenes Substrat für Plasmin
Sak	Wildtyp-Staphylokinase
Sak42D	Wildtyp-Staphylokinase Typ Jena
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
t-PA	tissue-type plasminogen activator
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TT	Thrombin time
u-PA	urokinase-type plasminogen activator
ZA	Zellaufschluss

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	6
1.1. Thrombininhibitoren	7
1.2. Plasminogenaktivatoren	11
2. AUFGABENSTELLUNG	13
3. MATERIALIEN UND METHODEN	14
3.1. Materialien	14
3.2. Methoden	15
3.2.1 Allgemeine Techniken	15
3.2.1.1. Proteinbestimmung	15
3.2.1.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	16
3.2.1.3. Elektroblothen	16
3.2.1.4. N-terminale Proteinsequenzierung	16
3.2.1.5. MALDI-MS-Analyse	17
3.2.2. Proteinpräparation	17
3.2.2.1. Konstruktion der Expressionssysteme	17
3.2.2.2. Zellanzucht	19
3.2.2.3. Zellaufschluss	19
3.2.2.4. Vorreinigung	20
3.2.2.5. Hochreinigung der Fusionsproteine	20
3.2.2.6. Hochreinigung der Dipetalin-Einzeldomänen	21
3.2.2.7. Präparation der His ₆ -Staphylokinase (H ₆ -Sak)	21
3.2.3. Biochemische und funktionelle Untersuchungen	22
3.2.3.1. Bestimmung der Plasminogenaktivierung durch Sak	22
3.2.3.2. Bestimmung der fibrinolytischen Wirkung	22
3.2.3.3. Messung der thrombinhemmenden Wirkung	22
3.2.3.4. Biacore-Interaktionsanalyse	23
3.2.3.5. Antikoagulatorische Aktivität	23
3.2.3.6. Messung der Plättchenaggregation	24
3.2.3.7. Experimente an isolierten Gefäßringen	24
3.2.4. Statistische Auswertung	25

4. ERGEBNISSE	25
4.1. Proteinreinigung	25
4.2. Biochemische und funktionelle Untersuchungen	27
4.2.1. Plasminogenaktivierung und fibrinolytische Aktivität	27
4.2.2. Hemmung der enzymatischen Thrombinaktivität	29
4.2.3. Biacore-Interaktionsanalyse	29
4.2.4. Antikoagulatorische Wirkung	31
4.2.5. Hemmung der Plättchenaggregation	34
4.2.6. Vaskuläre Effekte	34
5. DISKUSSION	36
6. ZUSAMMENFASSUNG	44
7. LITERATURVERZEICHNIS	46
8. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	57
9. DANKSAGUNG	58
10. LEBENSLAUF	59

1. Einleitung

In den vergangenen zehn Jahren konnte die Sterblichkeit bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt durch interventionelle und medikamentöse Therapieverfahren um ca. 30% gesenkt werden. Neben der perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) hat sich die medikamentöse Therapie mit Fibrinolytika, speziell Plasminogenaktivatoren, zur schnellen Rekanalisation thrombotisch verschlossener Koronargefäße bewährt. Durch die Schädigung der Gefäßwand bei der Angioplastie entsteht allerdings ein hohes prokoagulatorisches Potential am verengten Gefäßabschnitt. Deshalb ist der unterstützende Einsatz von Antikoagulantien zur Verhinderung einer Reokklusion sinnvoll, wobei Plättchenfunktionshemmern und Hemmstoffen des Thrombins eine besondere Bedeutung zukommt (Turpie *et al.* 1995). Die Hemmung der Thrombinwirkung ist möglicherweise auch ein entscheidender Ansatzpunkt für die Prävention der Restenose (Baykal *et al.* 1995, Gallo *et al.* 1998).

Die Serinproteinase Thrombin ist das Schlüsselenzym der Gerinnungskaskade und katalysiert die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin, welches unter Wirkung von Gerinnungsfaktor XIII durch Quervernetzung stabilisiert wird. Thrombin aktiviert zudem andere Gerinnungsenzyme wie Faktor XIII, die Gerinnungsfaktoren VIII und V sowie Protein C. Es kann bereits in sehr geringen Konzentrationen rezeptorvermittelte zelluläre Effekte an Endothelzellen und Thrombozyten induzieren (Glusa 1992). Die Klonierung und Expression des Thrombinrezeptors eröffnete neue Möglichkeiten zur Untersuchung der zellulären Thrombinwirkung bei der Pathogenese von Gefäßerkrankungen (Coughlin *et al.* 1992). Beim Menschen wurden Thrombinrezeptoren in gesunden Gefäßen vorwiegend auf Endothelzellen nachgewiesen, dagegen waren sie in arteriosklerotischen Gefäßbezirken auch in glatten Muskelzellen der Intima und in Makrophagen nachweisbar. Die thrombin-induzierte Proliferation glatter Muskelzellen scheint in kausalem Zusammenhang mit dem Auftreten einer Restenose nach erfolgreicher Thrombolyse zu stehen (Schwartz *et al.* 1995). Zur Auslösung der zellulären Effekte ist proteolytisch aktives, d.h. gerinnungsaktives, Thrombin erforderlich, das bei Thrombolyse oder aus wandständigen Thromben freigesetzt werden kann (Weitz 1995).

1.1. Thrombininhibitoren

Zur antithrombotischen Therapie werden bislang vorzugsweise Heparine und Cumarine eingesetzt. Mit niedermolekularen synthetischen direkten Thrombininhibitoren könnten auch bei enteraler Resorption therapeutische Plasmakonzentrationen erreicht werden. Die pharmakokinetischen und -dynamischen Eigenschaften dieser niedermolekularen Thrombinhemmstoffe sowie deren Thrombinspezifität sind bisher noch nicht zufriedenstellend (Hauptmann & Stürzebecher 1999). Zu hochwirksamen gerinnungshemmenden Substanzen gehören auch rekombinante Peptide und Proteine, die sich von natürlichen Wirkstoffen hämatophager Tiere ableiten (Tab. 1).

Tabelle 1: Thrombininhibitoren aus blutsaugenden Tieren (Markwardt 1994c)

Spezies	Stoff	Molekulargewicht	Gen kloniert
Pferdefliegen			
<i>Tabanus bovinus</i>	Tabanin	7 kDa	
Zecken			
<i>Ixodes ricinus</i>	Ixin	6,5 kDa	
Egel			
<i>Hirudo medicinalis</i>	Hirudin	7 kDa	+
<i>Hirudinaria manillensis</i>	Bufrudin	7 kDa	+
<i>Haemadipsia sylvestris</i>	Haemadin	5 kDa	+
Wanzen			
<i>Rhodnius prolixus</i>	Prolixin / Rhodniin	11 kDa	+
<i>Triatoma infestans</i>	Triatomin		
<i>Triatoma pallidipennis</i>	Pallidipin / Triabin	18 kDa	
<i>Eutriatoma maculata</i>	Reduviin / Maculatin		

Bisher sind solche Thrombininhibitoren aus Insekten, Egel, Schlangengiften und Pflanzen isoliert und charakterisiert worden (Noeske-Jungblut *et al.* 1995, Markwardt & Walsmann 1967, Arocas *et al.* 1996, Francischetti *et al.* 1997). Versuche zur Isolierung und funktionellen Charakterisierung dieser Proteine und deren klinische Anwendung waren von Fortschritten in der Molekularbiologie und der Proteinbiochemie abhängig (Markwardt 1994a, Bang & Clayman 1992). Aus hä-

matophagen Tieren isolierte thrombinhemmende Proteine (Tab. 1), in einigen Fällen auch rekombinant verfügbar, zeichnen sich durch eine außerordentlich hohe spezifische Wirkung auf Gerinnungsenzyme aus (Markwardt 1994a, 1996).

Hemmstoffe des Thrombins können an den unterschiedlichen Molekülregionen des Enzyms angreifen. Hirudin aus dem Blutegel *Hirudo medicinalis* nimmt dabei eine Sonderstellung ein, da es einen unikalen, nichtkanonischen Wirkungsmechanismus besitzt (Markwardt 1994a, 1996).

Hirudin

Das Polypeptid, bestehend aus 65 Aminosäuren, gilt als der stärkste der bekannten beschriebenen Thrombininhibitoren. Es bildet einen hochaffinen ($K_i \approx 27$ fM) monovalenten Komplex mit Thrombin (Markwardt 1994a, Stone & Hofsteenge 1986, Bode & Huber 1992). Hirudin blockiert das aktive Zentrum des Thrombins, ohne mit ihm direkt zu interagieren. Die Molekülkontakte des C-Terminus des Hirudins (Aminosäuren 54-65) finden maßgeblich mit der „anion-binding exosite“ des Thrombinmoleküls statt (s.u.). Die Enzymbindungsstasche ist gewissermaßen abgedeckt, wodurch das Eindringen des Substrates Fibrinogen und auch niedermolekularer synthetischer Thrombinsubstrate verhindert wird. Hirudin hemmt ebenso die thrombinbedingte Stimulation von Blutplättchen, Fibroblasten, Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen (Bar-Shavit *et al.* 1986). An glatten Muskelzellen werden die thrombinbedingten Kontraktionen durch Hirudin verhindert (Glusa & Paintz 1994). Die rezeptorvermittelten Thrombinreaktionen von Endothelzellen wie Freisetzung von EDRF, Prostacyclin, Endothelin, von Plasminogenaktivatoren und -inhibitoren werden ebenfalls gehemmt. In präklinischen Untersuchungen wurde die antithrombotische und antikoagulatorische Wirkung von Hirudin bei experimenteller Thrombose und Restenose, Hämodialyse, disseminierter intravasaler Gerinnung und extrakorporaler Zirkulation nachgewiesen (Heras *et al.* 1989, Bucha *et al.* 1990, Walenga *et al.* 1991, Markwardt 1994b, Kaiser *et al.* 1992, Rübsamen & Eschenfelder 1991). Nach pharmakologischen Untersuchungen (Markwardt 1994b) und der klinischen Prüfung erfolgte im Jahre 1997 die Zulassung von rekombinantem Hirudin zur antithrombotischen Behandlung bei der Heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT-II-Syndrom) und zur Thromboembolieprophylaxe nach Hüft- und Kniegelenkoperationen (Greinacher *et al.* 1999, Eriksson *et al.* 1996). Weitere klinische Indikationen zur Anwendung von Hirudin auf dem Gebiet

der Kardiologie und der Chirurgie (Anand 1999, Flather *et al.* 2000, Greinacher *et al.* 1999) sind in Vorbereitung.

Inhibitoren der „anion-binding exosite“ können die Enzymaktivität unterdrücken, ohne das katalytische Zentrum direkt zu blockieren; der Zutritt von Thrombinsubstraten bleibt möglich (Stone & Tapparelli 1995, Fareed *et al.* 1999, Jandrot-Perrus *et al.* 1996). Bindungsstellen („exosites“) sind spezifische Molekülregionen des Thrombins, welche die Enzymaktivität regulieren:

- Die Fibrinogen-Bindungsstelle („anion-binding exosite“) (Naski *et al.* 1990).
- Die Heparin-Bindungsstelle („heparin-binding exosite“) (Grutter *et al.* 1990, Rydel *et al.* 1990, Bode *et al.* 1992, Ye *et al.* 1994).

Zu den Exosite-Hemmstoffen gehören der „anion-binding exosite“- Inhibitor Triabin, isoliert und kloniert aus der Raubwanze *Triatoma pallidipennis* (Noeske-Jungblut *et al.* 1994, Glusa *et al.* 1997) sowie der „heparin-binding exosite“-Hemmstoff Haemadin aus dem Egel *Haemadipsia sylvestris* (Strube *et al.* 1993, Richardson *et al.* 2000).

Die auffällig schmale Substratbindungsfurche des Thrombins schränkt das Spektrum natürlicher Thrombinsubstrate und substratähnlich wirkender Hemmstoffe stark ein. Aufgrund ihrer Molekülgeometrie ist bisher nur von Kazal-Typ-Inhibitoren ein substratähnliches Eindringen in die Bindungsfurche des Thrombins bekannt (Kazal *et al.* 1948, van de Locht *et al.* 1995). Man spricht von kanonischen Thrombininhibitoren.

Rhodniin

Aus der Raubwanze *Rhodnius prolixus* wurde ein hochspezifischer Thrombinhemmstoff, das Rhodniin, isoliert (Friedrich *et al.* 1993). Die Zuordnung zu den Kazal-Typ-Inhibitoren erfolgte anhand der konservierten Aminosäuresequenz VCGxD (Kazal *et al.* 1948, Laskowski & Kato 1980). Das zweimalige Auftreten dieser Sequenz und weitere interne Sequenzhomologien führten zur Annahme, dass es sich um ein Zweidomänenmolekül handelt. Diese Annahme wurde durch die Aufklärung der Raumstruktur des inzwischen rekombinant dargestellten Proteins (Friedrich *et al.* 1993) im Komplex mit Thrombin bestätigt (van de Locht *et al.* 1995).

Rhodniin bildet mit Thrombin einen 1:1 stöchiometrischen Komplex mit einer Dissoziationskonstante K_D von $\approx 2 \times 10^{-13}$ M. Aus der Röntgenkristallstruktur des

Enzym-Inhibitor-Komplexes kann man entnehmen, dass jede der beiden Domänen unabhängig voneinander an die verschiedenen Bindungsstellen der Thrombinoberfläche bindet (van de Locht *et al.* 1995). Die N-terminale Domäne des Rhodniins bildet eine spezielle Bindungsschleife aus, die nach einem substratähnlichen Mechanismus mit dem aktiven Zentrum des Thrombins in Wechselwirkung tritt. Die C-terminale Domäne bindet an die „anion-binding exosite“ des Thrombins. Es ist derzeit unklar, ob der Interdomänen-Linker außer der Domänenverknüpfung auch eine spezielle funktionelle Bedeutung hat.

Bode *et al.* (1992) stellten die Hypothese auf, dass die zweite Domäne möglicherweise zuerst in einer weniger restriktiven Weise an die „anion-binding exosite“ bindet, bevor die N-terminale erste Domäne exakt in die Bindungstasche des Thrombins passt.

Dipetalin

Dieses Protein mit thrombinhemmender Wirkung wurde aus der Magen-Darm-Flüssigkeit der Raubwanze *Dipetalogaster maximus* isoliert (Gührs *et al.* 1996). Ausgehend von der N-terminalen Proteinsequenz des natürlichen Dipetalin-Isolates erfolgte die Klonierung des Dipetalin-Gens durch Dr. Hartmann im Institut für Molekulare Biotechnologie (IMB) Jena.

Im Gegensatz zum Rhodniin hat man unter Berücksichtigung der cDNA-Sequenz beim Dipetalin (Dip) von mindestens 4 Kazal-Typ-Domänen (I-IV) auszugehen. Anhand des experimentell ermittelten Molekulargewichtes und der N-terminalen Proteinsequenz kann im natürlich vorkommenden Protein das Vorliegen der beiden N-terminalen Domänen angenommen werden. Die Domänen Dip-I, Dip-II und Dip-I+II des Dipetalins wurden als Bestandteil eines Fusionsproteins mit Staphylokinase, einem Plasminogenaktivator, in *E. coli* exprimiert und zur Homogenität gereinigt (Schlott *et al.* in Druck). Durch das Vorhandensein des VCGxD-Motivs wurde die Zugehörigkeit des Dipetalins zur Kazal-Inhibitorfamilie deutlich (Laskowski & Kato 1980). Das aus dem o.g. Fusionsproteinansatz isolierte Protein Dip-I+II entspricht dem natürlichen Wirkstoff. Die Sequenzen der ersten Dip-Domäne und des Rhodniins weisen mit 71% einen hohen Grad an Homologie auf (Abb. 1). Der Homologiegrad von Dip-II ist dagegen signifikant geringer (55%). Verglichen mit Rhodniin finden sich gerade im Bereich des ersten Interdomänen-

Linkers von Dipetalin auffällig viele Insertionen von Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten.

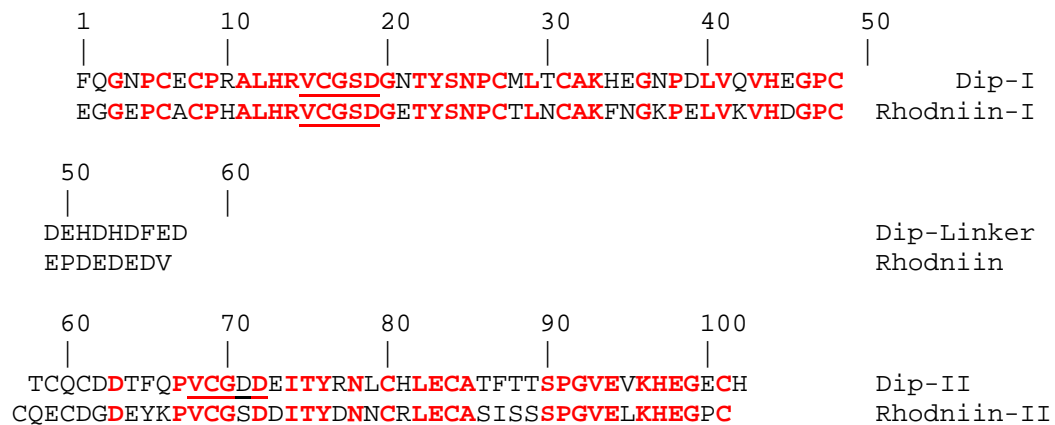


Abb. 1: Aminosäuresequenzen des Dipetalins und des Rhodniins. Homologe Aminosäuren sind farbig markiert. VCGxD-Motiv der Kazal-Inhibitorfamilie.

Die Arbeitsgruppe Nowak und Mitarbeiter beschrieben Reinigung, Klonierung, Expression und funktionelle Charakterisierung des vermutlich gleichen Proteins, welchem der Namen Dipetalogastin gegeben wurde (Lange *et al.* 1999, Mende *et al.* 1999, Nowak *et al.* 1999). Der Vergleich der von den c-DNAs abgeleiteten Aminosäuresequenzen ergab eine völlige Übereinstimmung in den vier beschriebenen Domänen.

In der vorliegenden Arbeit wurde konsequent der o.g. Fusionsproteinansatz unter Einbeziehung des Plasminogenaktivators Staphylokinase verfolgt. Die Zielstellungen berücksichtigten deshalb den möglichen bifunktionellen Charakter der Fusionsproteine und schlossen sowohl die Charakterisierung der thrombinhemmenden als auch der plasminogenaktivierenden und profibrinolytischen Aktivitäten ein.

1.2. Plasminogenaktivatoren

Plasminogenaktivatoren wandeln das im Plasma zirkulierende Zymogen Plasminogen in Plasmin um. Dieses baut Fibrin zu löslichen Fibrinfragmenten ab, wodurch es zur Gerinnsellyse kommt (Collen 1980). Die Plasminogenaktivierung erfolgt enzymatisch durch limitierte proteolytische Spaltung der Peptidbindung Arg⁵⁶¹-Val⁵⁶² im Zymogen. Die endogenen Plasminogenaktivatoren t-PA und u-PA,

ebenfalls Serinproteasen, spalten direkt Plasminogen, während exogene bakterielle Plasminogenaktivatoren wie Streptokinase und Staphylokinase die Aktivierung indirekt induzieren, da sie selbst keine Enzyme sind. Sie bilden 1:1 stöchiometrische Komplexe mit Plasminogen bzw. Plasmin, die dann enzymatisch die Spaltung der o.g. Peptidbindung im Plasminogen ausführen.

Staphylokinase (Sak)

Sak ist ein aus 136 Aminosäuren bestehendes Protein. Die fibrinolytische Wirkung der Sak wurde erstmals von Christie und Wilson (1941) beschrieben. Sak-Gene wurden aus den Staphylokokkenphagen ϕ C (Sako *et al.* 1983) und 42D (Behnke & Gerlach 1987) oder lysogenen Stämmen von *Staphylococcus aureus* kloniert (Collen *et al.* 1992). Die entsprechenden exprimierten Proteine tragen die Bezeichnungen Sak ϕ C, Sak42D und SakSTAR. Erste Charakterisierungen der Sak42D-Variante erfolgten durch Gerlach *et al.* (1988), Sako (1985) untersuchte Sak ϕ C. Nach Realisierung eines Hochexpressionssystems für Sak42D und dem Etablieren eines effizienten Proteinreinigungsverfahrens wurden detaillierte Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der Sak möglich (Schlott *et al.* 1994b). Demgemäss bildet Sak mit Plasminogen zunächst einen inaktiven Komplex. Erst durch Umwandlung zu einem Sak-Plasmin-Komplex ist dieser in der Lage, Plasminogen zu Plasmin zu aktivieren (Kowalska-Loth & Zakrzewski 1975, Lijnen *et al.* 1992, Collen *et al.* 1993). Spuren an Plasmin, die in der unmittelbaren Umgebung von Blutgerinnseln auftreten können, sind für diesen Prozess essentiell. Freies Plasmin wird jedoch sofort durch α_2 -Antiplasmin inaktiviert, wogegen an Fibrin(ogen) gebundenes Plasmin nicht abgebaut werden kann. Collen *et al.* (1993) beschrieben die in vivo-Wirkung der Sak als fibrinspezifisch.

Durch Mutationsstudien und chemische Modifikation am Protein gelang die Lokalisation funktional wichtiger Orte im Staphylokinasemolekül (Gase *et al.* 1996, Schlott *et al.* 1994a, 1997, 1998, Silence *et al.* 1995). Untersuchungen zur Molekülstruktur brachten weitere Fortschritte zum Verständnis des Wirkmechanismus. Ohlenschläger *et al.* (1997, 1998) stellten die NMR-Lösungsstruktur der Sak vor. Parry *et al.* (1998) gelang die Bestimmung der Röntgenkristallstruktur des Funktionskomplexes aus Sak mit Mikro-Plasmin.

In speziellen Untersuchungen wurden Vergleiche der fibrinolytischen Wirkprofile zwischen Sak und den endogenen Aktivatoren t-PA und u-PA sowie Streptokinase vorgenommen (Hauptmann & Glusa 1995, Hauptmann *et al.* 1995). Bisher durchgeführte klinische Studien haben gezeigt, dass Sak bei 62% der Patienten mit Myokardinfarkt eine vergleichbar frühzeitige Reperfusion erzielt wie t-PA (58%) (Vanderschueren *et al.* 1995). Sie vermag auch die Lyse von plättchenreichen Gerinnseln zu induzieren (Lijnen *et al.* 1992, Collen *et al.* 1993). Staphylokinase gilt daher als ein geeigneter Wirkstoff für die klinische Therapie thromboembolischer Erkrankungen.

Bestrebungen zur Verbesserung der Thrombolyse zielen u.a. auf eine Verminderung der Reokklusionsgefahr nach erfolgreicher Gerinnselauflösung ab. Ein geeigneter Weg könnte die Herstellung von Fusionsproteinen sein, bestehend aus einem Plasminogenaktivator wie Sak und thrombinhemmenden Proteinen oder Peptiden (Collen & Lijnen 1995).

In der Literatur wurde über Versuche berichtet, Staphylokinase mit thrombinhemmenden Wirkstoffen und/ oder Plättcheninhibitoren (van Zyl *et al.* 1997, Szarka *et al.* 1999, Szemraj *et al.* 2001) zu fusionieren. Die rekombinant hergestellten Fusionsproteine besaßen die erwarteten bifunktionellen Eigenschaften nicht in voller Ausprägung.

2. Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit ist die Bewertung der Bifunktionalität von Fusionsproteinen aus Staphylokinase und verschiedenen Dipetalin-Domänen hinsichtlich ihrer thrombinhemmenden und plasminogenaktivierenden Wirkung sowie die funktionelle Wichtung der einzelnen Dip-Domänen und des Interdomänen-Linkers. Einen Schwerpunkt bildet die Expression in *E. coli* und die Reinigung der Fusionsproteine sowie der einzelnen Dipetalin-Domänen. Alle gereinigten Proteine werden in einem zweiten Abschnitt biochemisch und funktionell charakterisiert. Die in biochemischen Tests gewonnenen Resultate werden durch zellbiologische und pharmakologische Untersuchungen untermauert. Diese umfassen die globalen Gerinnungstests, die Messung der fibrinolytischen Wirkung sowie den Einfluss auf die thrombinbedingte Plättchenaggregation und die Gefäßreaktionen.

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

Chemikalien

ADP	Adenosindiphosphat, <i>Serva Heidelberg</i>
DAPTTIN [®]	Kaolin/ Sulfatid-Phospholipid
(PTT-Reagenz)	<i>Immuno AG Wien, Österreich</i>
DFP	Diisopropylfluorophosphat <i>SIGMA-Aldrich, Taufkirchen</i>
EDTA-Tyrode-Lösung	Gemisch aus 15 ml EDTA 1%ig sowie 135 ml kalzi- umfreie Tyrodelösung pH 7,2
Immunoplastin HIS	Heparin-insensitives Ca-Thromboplastinreagenz
(PT-Reagenz)	<i>Immuno AG Wien, Österreich</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid <i>SIGMA-Aldrich Taufkirchen</i>
Krebs-Henseleit-Lösung	118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgPO ₄ , 1,2 mM KH ₂ PO ₄ , 2,5 mM CaCl ₂ , 11,1 mM Glucose, 25 g Na- HCO ₃ , pH 7,2 - 7,4
Kollagen	HORM Kollagenreagenz, <i>Nykomed Arzneimittel GmbH,</i> <i>Ismaning bei München</i>
PMSF	Polymethylsulfonylfluorid <i>Serva Feinbiochemica Heidelberg</i>
Tyrode-Lösung	8,5 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,0 g NaHCO ₃ , 0,05 g NaH ₂ PO ₄ , 1,0 g Glucose, 1,05 ml 1 M MgCl ₂ ad 1,0 l Aqua dest.

Proteine

Fibrinogen	bovines Fibrinogen, Proteingehalt 61% (Biuret), gerinnbares Protein 95%, <i>SIGMA-Aldrich, Steinheim</i>
Plasminogen	IMB Jena (Deutsch & Mertz 1970)
Staphylokinase	Laborpräparat rekombinante Sak42D (Wildtyp) <i>IMB Jena (Schlott et al. 1994b)</i>

Proteasen

Faktor Xa	<i>New England Biolabs, Frankfurt am Main</i>
-----------	---

Thrombin für Thrombinhemmungstest und Biacore-Analyse:

Enzyme Research Laboratories, South Bend, USA

Thrombinzeitbestimmung: *Immuno AG, Wien*

Plättchenaggregation und Fibrinplattentest: *Feinchemie GmbH Sebnitz*

Synthetische Enzym-Substrate

S-2238 Thrombin-Substrat, H-D-Phe-Pip-Arg-pNA · 2 HCl

S-2251 Plasmin-Substrat, H-D-Val-Leu-Lys-pNA · 2 HCl

Haemochrom Diagnostica GmbH Essen

Die übrigen Chemikalien, ausschließlich von p.a. Qualität, wurden von den Firmen Fluka, Merck, Roth, Serva und Sigma bezogen. Zum Ansatz von Puffern und Lösungen wurde Reinstwasser einer Milli-Q-Plus-Reinstwasseranlage (Millipore, Eschborn) verwendet.

Sofern nicht anders ausgewiesen, beziehen sich alle Konzentrationsangaben im Text auf die Endkonzentrationen.

3.2. Methoden

3.2.1 Allgemeine Techniken

3.2.1.1. Proteinbestimmung

Unter Benutzung der Internet-Software "Expert Protein Analysis System" (EXPASy, <http://www.expasy.ch>) wurden ausgehend von den jeweiligen Primärsequenzen der Proteine die in Tab. 2 aufgeführten physikochemischen Eigenschaften bestimmt (Appel *et al.* 1994). Die Proteinkonzentrationen von gereinigten Proteinpräparaten wurden aus dem bei 280 nm gemessenen Absorptionswert (Spektralphotometer UV-16 Shimadzu, Duisburg) unter Zuhilfenahme des entsprechenden molaren Absorptionskoeffizienten berechnet.

Tabelle 2: Physikochemische Daten laut ExPASy

Präparat	Anzahl der Aminosäuren	Molekulargewicht in Dalton (Da)	Isoelektrischer Punkt pI	Molarer Absorptionskoeffizient
Dip-I	55	6083	4,77	0,329
H ₆ -Sak-Dip-I	203	23167	6,17	0,829
Dip-II	58	6598	4,08	0,303
H ₆ -Sak-Dip-II	206	23716	5,56	0,81
Dip-I+II	108	12011	4,28	0,333
H ₆ -Sak-Dip-I+II	256	29095	5,4	0,729
H ₆ -Sak-IEGR	148	17268	8,86	0,997

3.2.1.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Bestimmung der Fusionsprotein- bzw. Dipetalin-enthaltenden Fraktionen, welche aus den chromatographischen Trennverfahren resultierten, wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach der Methode von Laemmli (1970) eingesetzt. Dazu wurde das vertikale Elektrophoresesystem Mini-gel-Twin™ und zugehöriges Standardzubehör (Whatman Biometra®, Göttingen) genutzt. Verwendet wurden selbst gegossene 13,75%ige Polyacrylamid-Gele. Die zu analysierenden Proben wurden nach Zugabe des Probenpuffers (Verhältnis Probe : Probenpuffer = 5 : 1) 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Färbung der Proteinbanden erfolgte durch Coomassie Brilliant Blau (Pharmacia, Freiburg).

3.2.1.3. Elektrolotten

Zur Vorbereitung auf die N-terminale Sequenzanalyse wurden per SDS-PAGE getrennte Proteine in der Trans-Blot® - Apparatur (Bio-Rad, München) auf eine PVDF-Membran nach der Methode von Gültekin und Heermann (1988) geblottet.

3.2.1.4. N-terminale Proteinsequenzierung

Die Mikrosequenzierung nach Edman liefert bei Einsatz von mindestens 50 pg reinem Protein Sequenzen von 20 bis 30 Aminosäuren Länge, wobei die Identifizierung der Aminosäuren durch High Performance Liquid Chromatography (HPLC) erfolgt (Edman 1950). Die N-terminale Aminosäuresequenzierung von auf PVDF-

Membran geblotteten Proteinen wurde mit dem Proteinsequenzer Modell 494 (Applied Biosystems, Weiterstadt) im Proteinlabor des IMB Jena durchgeführt.

3.2.1.5. MALDI-MS-Analyse

Die Massen der gereinigten Proteine wurden mittels MALDI-TOF-Massenspektroskopie im Proteinlabor des IMB bestimmt (Beavis & Chait 1996).

3.2.2. Proteinpräparation

Die Isolierung der Proteine erfolgte nach einem Fünfstufen-Schema, das die chromatographischen Verfahren Affinitäts-, Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration einschloss. Die Verknüpfung der Teilschritte ist in Abb. 2 dargestellt. Die chromatographischen Trennungen erfolgten bei 4 °C. Alle Chromatographie-Materialien bzw. Fertig-Chromatographie-Säulen stammen von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg). Die Proteinreinigung wurde an ÄKTA® und FPLC® Chromatographieanlagen durchgeführt.

3.2.2.1. Konstruktion der Expressionssysteme

Dipetalin wurde aus dem Magen-Darm-Trakt der südamerikanischen Raubwanze *Dipetalogaster maximus* in der Abteilung Biochemie des IMB Jena isoliert. Dort wurden auch die Expressionsplasmide und die entsprechenden *E. coli*-Expressionsstämme hergestellt (Schlott et al. in Druck). Alle Dipetalin-Domänen bzw. das Zweidomänenprotein Dip-I+II werden als Fusionsproteine mit Staphylokinase Sak42D (Abb. 3) exprimiert. Die Sak besitzt zusätzlich eine N-terminale H₆-Sequenz (His-Tag) und C-terminal eine IEGR-Faktor Xa-Schnittstelle. Daran schließt sich die jeweilige Dipetalin-Sequenz an. Die Expression der Zielproteine wurde mit IPTG induziert.

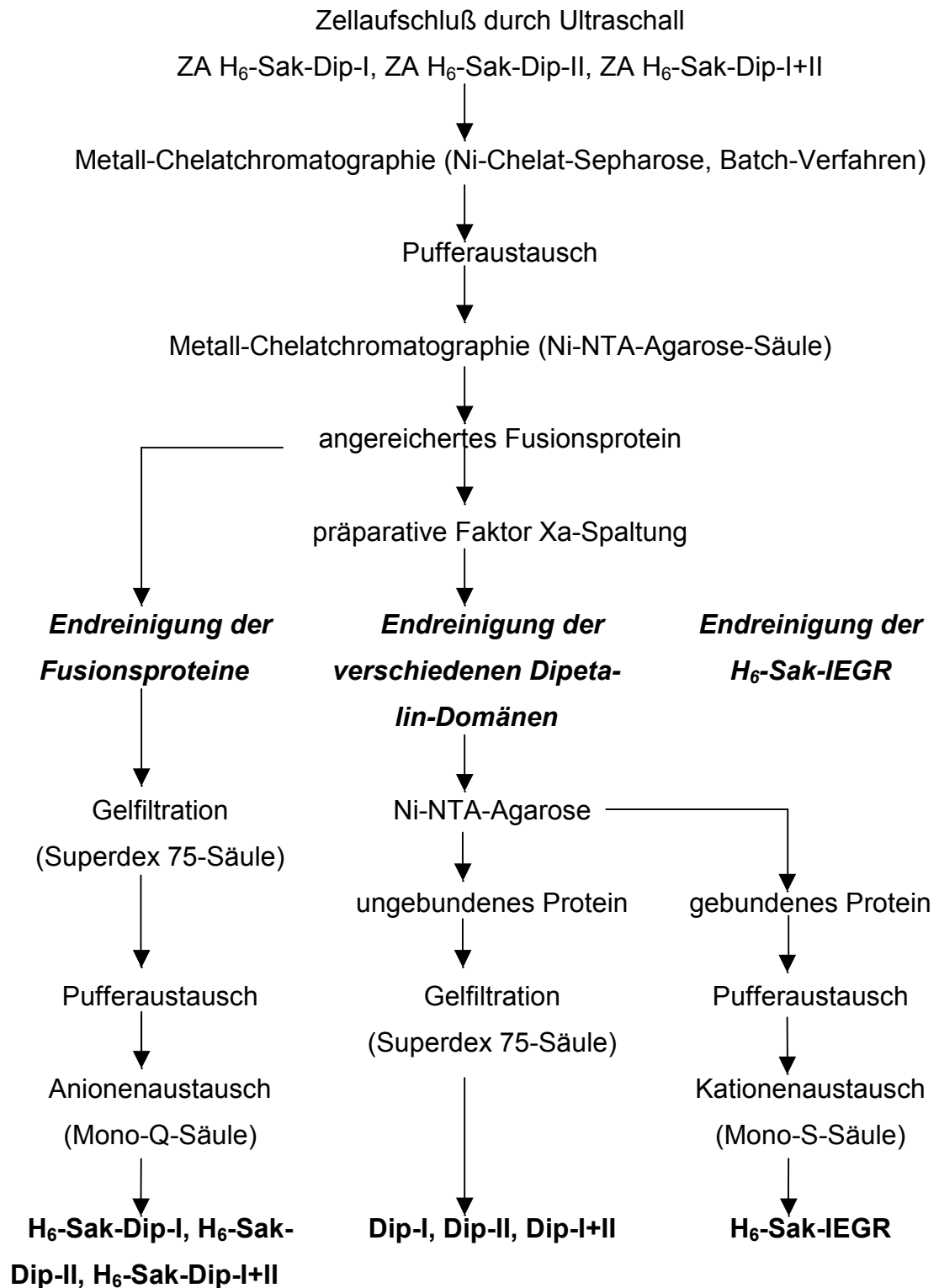


Abb. 2: Schematische Darstellung der Proteinpräparation

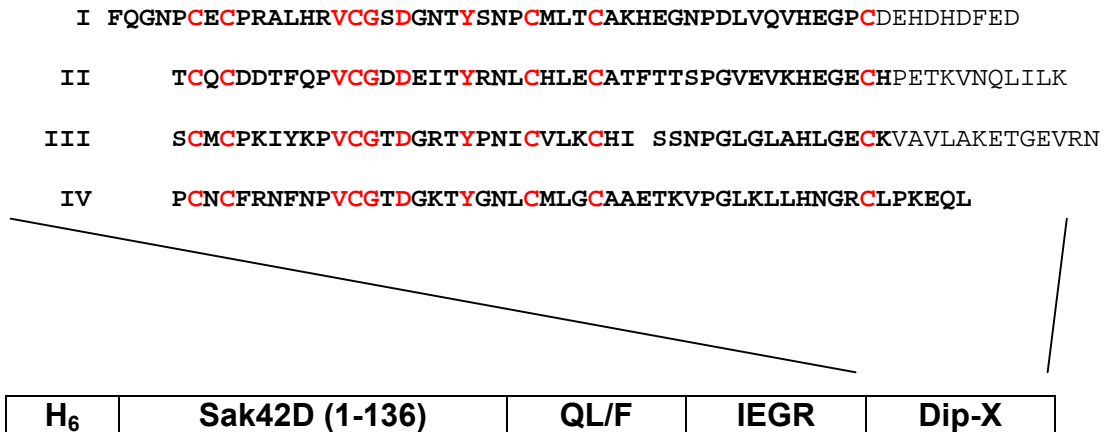


Abb. 3: Schema der Fusionsproteinkonstrukte. Farblich dargestellte Aminosäuren verdeutlichen die Kazal-typischen Aminosäurepositionen in allen 4 Dipetalin-Domänen. Die einzelnen Dipetalin-Domänen sind durch fett gedruckte Aminosäuren ausgewiesen. Halbfett gedruckte Aminosäuren kennzeichnen die Interdomänen-Linker.

3.2.2.2. Zellanzucht

Nach Kultivierung (Kulturvolumen 2 - 4 l) und IPTG-Induktion exprimierten entsprechend transformierte *E. coli*-TG1-Zellen die Fusionsproteine H₆-Sak-Dip-I, H₆-Sak-Dip-II und H₆-Sak-Dip-I+II intrazellulär und in gelöster Form. Die Zellen wurden durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 4200 U/min gewonnen, nach Waschen in physiologischer Kochsalzlösung für 20 min bei 5000 U/min zentrifugiert und bis zur Verarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

Zur Darstellung der Fusionsproteine wurden während der Zellkultivierung Proben von IPTG-stimulierten und nicht stimulierten Zellen entnommen und eine SDS-PAGE durchgeführt. Eine deutlich verstärkt auftretende Proteinbande im Gel zeigt die Überexpression in IPTG-stimulierten Zellen an. Die korrekte N-terminale Aminosäuresequenz wurde durch Proteinsequenzierung bestätigt. Bei der Präparation der einzelnen Dipetalin-Domänen wurde auf die gleiche Art verfahren.

3.2.2.3. Zellaufschluss

Die Zellen wurden bei einer Temperatur von 4 °C mit Zellaufschlusspuffer (20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8,0; unmittelbar vor Verwendung Zugabe von 600 µl 100 mM PMSF auf 100 ml Puffer) suspendiert und mit Ultraschall (BRANSON Ultraschall-Desintegrator SONIFIER 250, 10 min effektive Schallapplikation, Grenztemperatur 4 °C, Output Control „2“; Branson Ultrasonic S.A., Carouge-

Genève, Schweiz) aufgeschlossen. Der Zellaufschluss wurde 30 min bei 18000 U/min zentrifugiert. Im Überstand wurde eine Imidazol-Konzentration von 10 mM eingestellt.

3.2.2.4. Vorreinigung

In den ersten beiden Reinigungsschritten wurde die Interaktion der H₆-Tag-Fusionsproteine mit Ni-Chelat-Sepharose genutzt. Der mit Imidazol versetzte Aufschlussüberstand wurde zunächst im Batch-Verfahren an Ni-Chelat-Sepharose gebunden. Durch fünfmaliges Waschen mit Waschpuffer (20 mM Tris, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0) wurden schwach bindende Proteine entfernt. Durch viermaliges Waschen mit Elutionspuffer (20 mM Tris, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0) wurde das jeweilige Fusionsprotein eluiert. Sämtliche Wasch- und Elutionsfraktionen wurden gesammelt und die Fusionsprotein enthaltenden Fraktionen durch SDS-PAGE analysiert. Fusionsproteinhaltige Fraktionen (100 - 150 ml) wurden durch Ultrafiltration (PM 10-Membran) auf ein Volumen von maximal 30 ml konzentriert. Auf einer HiPrep[®] 26/10 Entsalzungssäule wurde die Proteinlösung in den Startpuffer E1 (20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8,0) der zweiten Reinigungsstufe überführt. Anschließend wurde die Imidazol-Konzentration auf 10 mM eingestellt.

Im zweiten Reinigungsschritt, Chromatographie an einer Ni-NTA-Agarose-Säule (26 x 32 mm), kamen die gleichen Puffer wie im Batch-Verfahren zum Einsatz. Auch hier wurden die Fusionsprotein enthaltenden Fraktionen mittels 13,75%iger SDS-PAGE bestimmt.

3.2.2.5. Hochreinigung der Fusionsproteine

Nach Auswahl der fusionsproteinhaltigen Fraktionen wurde die Hälfte des Materials durch Ultrafiltration (s. 3.2.2.4) auf ein maximales Volumen von 2 ml konzentriert. Durch Gelfiltration an einer Superdex75-Säule in S75-Puffer (20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8,0) wurden die Fusionsproteine weiter angereichert und gleichzeitig umgepuffert. Zur abschließenden Reinigung durch Anionenaustauschchromatographie an einer Mono-Q-Säule HR 10/10 wurden die Fusionsprotein enthaltenden Fraktionen (SDS-PAGE) in der 50 ml-Amicon-Zelle (PM 10-Membran) durch wiederholtes Auffüllen von Mono-Q-Puffer A (20 mM Tris, pH 8,5) umgepuffert und auf maximal 5 ml konzentriert. Mit dem gleichen Puffer

wurde die Säule äquilibriert. Die Elution der Fusionsproteine erfolgte mit einem linear ansteigenden NaCl-Gradienten (20-faches Säulenvolumen), gebildet aus Mono-Q-Puffer A und Mono-Q-Puffer B (20 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8,5). Die Fusionsproteine wurden in reiner Form (SDS-PAGE) von der Säule eluiert.

3.2.2.6. Hochreinigung der Dipetalin-Einzeldomänen

Die zweite Hälfte der vorgereinigten Fusionsprotein-Fraktionen (s. 3.2.2.5) wird bei Raumtemperatur für die Dauer von 16 h der Faktor-Xa-Spaltung unterworfen. Durch Umpuffern in Puffer E2 (20 mM Tris, 100 mM NaCl) über die Entsalzungssäule (s. 3.2.2.4), Zugabe von 200 mM CaCl_2 bis zur Endkonzentration von 2 mM und Verdünnen auf eine Proteinkonzentration von 0,75 mg/ml (s. 3.2.1.2) wurden zunächst optimale Spaltbedingungen eingestellt. Die Spaltungsreaktion wurde durch Zugabe von DFP gestoppt und die Probe für die Trennung der Spaltprodukte an der Ni-NTA-Agarose-Säule vorbereitet. Bei der Trennung wurde analog zu 3.2.2.4 verfahren. Die vereinten dipetalinhaltigen Fraktionen (SDS-PAGE) wurden über eine YM 3-Membran auf ein Volumen von 2 ml ultrafiltriert. Die Endreinigung erfolgte durch Gelfiltration an einer Superdex 75-Säule in S75-Puffer. In der SDS-PAGE stellten sich die Dipetalin-Einzeldomänenproteine in reiner Form dar.

3.2.2.7. Präparation der His₆-Staphylokinase (H₆-Sak)

Die Staphylokinase mit N-terminalem His-Tag und C-terminaler Faktor Xa-Erkennungssequenz fällt nach FXa-Spaltung und anschließender Affinitätschromatographie an der Ni-NTA-Säule im Eluat an. Dieses Material wurde durch Kationenaustauschchromatographie an einer Mono-S-Säule HR 5/5 gereinigt. Durch wiederholtes Auffüllen von Mono-S-Puffer A (20 mM Na-Acetat, pH 5,0) wurde die Proteinlösung in der Amicon-Zelle (PM 10-Membran) umgepuffert und auf ein Volumen von 5 ml eingeeengt. Mit dem gleichen Puffer wurde die Säule äquilibriert. Auch hier wurde mit einem linearen Salzgradienten (20-faches Säulenvolumen) eluiert, der aus Mono-S-Puffer A und Mono-S-Puffer B (20 mM Na-Acetat, 1 M NaCl, pH 5,0) gebildet wurde. H₆-Sak-IEGR lag im Eluat in reiner Form vor (SDS-PAGE).

3.2.3. Biochemische und funktionelle Untersuchungen

3.2.3.1. Bestimmung der Plasminogenaktivierung durch Sak

Gleiche Volumina (20 µl) der Aktivatorsubstanzen (5 nM) und Plg (1,5 µM) wurden in Aktivierungspuffer (100 mM PO_4^{3-} , pH 7,4, 0,1% Tween 80) gemischt. Dieser Ansatz wurde 5 min bei 37°C inkubiert. Aliquots (5 µl) davon wurden nach 5, 10, 20 und 30 min entnommen und in 200 µl S-2251-Plasmin-Substratlösung (1 mM) überführt, um die Menge des aus Plasminogen gebildeten Plasmins zu bestimmen. Das geschah durch Messung der Absorptionsänderung pro min bei 405 nm. Eine Änderung der Absorption von $0,060 \text{ min}^{-1}$ entspricht einer Konzentration von 23,8 nM Plasmin in der Substratlösung.

3.2.3.2. Bestimmung der fibrinolytischen Wirkung

Der Fibrinplattentest wurde nach Astrup und Müllertz (1952) durchgeführt.

Zur Herstellung von 6 Fibrinplatten wurden 40 ml Agar durch Erhitzen im siedenden Wasserbad verflüssigt und danach auf 42 °C abgekühlt. Nach Hinzufügen von 20 ml Fibrinogenlösung (1%iges plasminogenhaltiges Rinderfibrinogen in physiologischer Kochsalzlösung) sowie 1,2 ml Humanplasma wurde die Mischung mit 0,6 ml 1%igem Merthiolat konserviert. Von diesem Gemisch wurden 10 ml in auf 37 °C vorgewärmte Petrischalen (Ø 9 cm) gegeben, die vorher mit 0,5 ml Thrombinlösung (50 IE/ml in phys. NaCl) benetzt worden waren. Bis zum Erstarren des Agars wurden die Platten waagrecht und erschütterungsfrei bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Anschließend wurden Löcher von 5,5 mm Durchmesser ausgestanzt, mit 30 µl der jeweiligen Testsubstanz beschickt und die Fibrinplatten für 20 Stunden bei 37°C inkubiert. Die fibrinolytische Wirkung der zu untersuchenden Substanzen wurde durch Messung der entstandenen Lysefläche ermittelt.

3.2.3.3. Messung der thrombinhemmenden Wirkung

Zur Bestimmung der thrombinhemmenden Aktivität der präparierten Proteine wurde das chromogene Substrat S-2238 verwendet.

Eine Thrombinlösung (30 µl, 50 pM) wurde mit gleichen Volumina der zu testenden Inhibitorlösung bei variierender Proteinkonzentration (10 - 120 / 100 - 400 pM) gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde das Enzym-Inhibitor-Gemisch in 150 µl S-2238-Substratlösung (50 µM) überführt. Die Änderung der Absorption bei 405 nm wurde in 1-minütigen Intervallen über einen Zeit-

raum von 30 min registriert. Die Geschwindigkeiten der enzymatischen Reaktion bei jeweiliger Inhibitorkonzentration (v) wurden ins Verhältnis zur Geschwindigkeit der Reaktion ohne Zusatz der Inhibitorsubstanz (v_0) gesetzt. Das Verhältnis v/v_0 in % wurde in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanzen grafisch dargestellt und zur Berechnung der Inhibitionskonstante K_i verwendet. Die Berechnungen stützen sich auf die Theorie der slow, tight-binding-Inhibition (Morrison & Stone 1985, Stone & Hofsteenge 1986).

3.2.3.4. Biacore-Interaktionsanalyse

Grundlage dieser Untersuchungstechnik zur Echtzeiterfassung von molekularen Wechselwirkungen ist das Phänomen der Oberflächenplasmonresonanz, welche in dünnen Metallfilmen im Zustand totaler innerer Reflektion entsteht (Kretschmann & Raether 1968). Hier spiegelt dieses Phänomen die Massenänderung von Makromolekülen pro Zeiteinheit auf einer Sensor-Chipoberfläche wider. Ein Reaktand wird an der Sensoroberfläche immobilisiert (Ligand). Die Lösung mit dem/den anderen Reaktanden (Analyt) fließt kontinuierlich über die Oberfläche hinweg. Bindet der Analyt an den Liganden, wird ein Signal registriert. Mit Hilfe der Biacore-Analyse-Software wurden die Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation (k_a) und Dissoziation (k_d) sowie die Dissoziationskonstante $K_D = k_d / k_a$ berechnet.

Die Interaktionsanalyse zwischen den Dipetalin-Domänen und Thrombin erfolgte mit dem BIACORE™ 2000 und zugehörigen Verbrauchsmaterialien und Pufferlösungen (Biacore AB, Freiburg i. Br.). In unseren Experimenten wurden die Fusionsproteine H₆-Sak-Dip-I, H₆-Sak-Dip-II, H₆-Sak-Dip-I+II und H₆-Sak-IEGR als Kontrolle über ihren His-Tag an die Ni-NTA-Sensoroberfläche gebunden. Thrombin wurde in einem Konzentrationsbereich von 10 – 100 nM eingesetzt. Die Messung erfolgte nach den Angaben des Herstellers bei 25 °C und wurde für jede Konzentration doppelt ausgeführt.

3.2.3.5. Antikoagulatorische Aktivität

Zur Messung der antikoagulatorischen Wirkung wurden die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), die Thrombinzeit (TT) und die Prothrombinzeit (PT) bestimmt. Blut von gesunden Blutspendern wurde nach Entnahme mit Zitratmonovetten 15 min bei 2500 U/min in der Biofuge 28RS (Heraeus Instruments, Hanau)

zentrifugiert und der Überstand (Plasma) abgehoben. Die Messung der aPTT, TT und PT erfolgte mit dem Koagulometer Thrombotrack 4 (Immuno GmbH, Heidelberg) nach den Angaben des Herstellers.

3.2.3.6. Messung der Plättchenaggregation

Die quantitative Bestimmung der Aggregation erfolgte mit Hilfe der von Born (1962) entwickelten turbidimetrischen Methode. Zitrat-antikoaguliertes Blut von gesunden Blutspendern wurde 10 min bei 1600 U/min in der Biofuge 28RS (Heraeus Instruments, Hanau) zentrifugiert. Das plättchenreiche Plasma wurde abgehoben und bei 4200 U/min zentrifugiert. Die Plättchen wurden zweimal in 10 ml EDTA-Tyrode-Lösung gewaschen, danach in kalziumfreier Tyrode-Lösung resuspendiert und auf eine Zahl von 3×10^8 Plättchen/ml eingestellt. Von dieser Suspension wurden 170 µl mit 20 µl Testsubstanz (10 – 100 nM) und 10 µl Kalziumchlorid (1,8 mM) gemischt und 3 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 10 µl Thrombin (0,1 IE/ml) wurde die Aggregation ausgelöst und die Transmissionsänderung über einen Zeitraum von 10 min im Aggregometer APACT 4 (Labor GmbH Ahrensburg) gemessen. Bei diesem Versuchsablauf wurde das Aggregometer mit Tyrode-Lösung kalibriert.

Für die ADP- und Kollagen-induzierte Plättchenaggregation wurde plättchenreiches Plasma (PRP) eingesetzt. Bei diesen Versuchen wurde das Aggregometer mit plättchenarmem Plasma kalibriert.

3.2.3.7. Experimente an isolierten Gefäßringen

Die vaskulären Thrombineffekte wurden an isolierten Pulmonalarterien vom Schwein geprüft, wie von Glusa *et al.* (1994) beschrieben. Kleine Seitenäste der A. pulmonalis von Schweinelungen wurden freipräpariert, in 2 - 3 mm breite Ringe geschnitten und zwischen L-förmigen Platindrähten in einem mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) durchströmten Organbad (Volumen 10 ml, Temperatur 37 °C) vertikal eingespannt, wobei der untere Draht am Boden des Organbades fixiert und der obere mit einem isometrischen Kraftwandler (Isometric force transducer F 30, Typ 372, Hugo-Sachs-Elektronik, March-Hugstetten) verbunden wurde.

Während der gesamten Versuchsdauer wurden die Gefäßringe mit 2 g belastet. Nach einer Adaptationszeit von 60 min erfolgte zunächst die Kontraktion mit Kaliumchlorid (45 mM). In der sich anschließenden Auswasch- und Erholungsphase

wurde im Abstand von 45 min drei mal eine Kontraktion mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ (3 μM) ausgelöst. Nach der letzten Zugabe von $\text{PGF}_{2\alpha}$ hatte die Kontraktion eine konstante Amplitude erreicht. Die zu prüfenden Fusionsproteine und Dipetalin-Präparate wurden 5 min vor der Thrombinzugabe dem Organbad zugesetzt. Die Integrität des Endothels wurde anhand der durch Bradykinin induzierten Relaxation der vor-kontrahierten Gefäßringe beurteilt. Nach Zugabe von Bradykinin (10 nM) wurde bei intaktem Endothel eine Relaxation von $90 \pm 6,6\%$ erreicht. Nach mechanischer Entfernung des Endothels betrug die Bradykinin-induzierte Relaxation $< 10\%$. Die durch die präparierten Proteine induzierte endothelabhängige Relaxation wurde in Prozent zur maximalen $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induzierten Kontraktion (= 100%) gemessen.

3.2.4. Statistische Auswertung

Alle Daten sind Mittelwerte mit Standardabweichung bzw. SEM, die mit den Programmen Excel (Microsoft, USA) und Origin (Microcal Inc., USA) berechnet wurden. Für die statistische Analyse wurde der t-Test nach einer Modifikation von Bonferroni verwendet. Bei $p < 0,05$ wurde eine statistische Signifikanz festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1. Proteinreinigung

Die Fusionsproteine H₆-Sak-Dip-I, H₆-Sak-Dip-II und H₆-Sak-Dip-I+II lagen in den *E. coli*-Zellaufschlüssen überexprimiert und in löslicher Form vor. Anhand densitometrischer Auswertungen mit der Gelscansoftware „ImageMaster 1D Prime“ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) entsprechender Polyacrylamidgele wurde ermittelt, dass der Anteil der Fusionsproteine im Zellaufschluss ca. 17% erreicht.

Durch die 5-Stufen-Reinigungstechnik konnten H₆-Sak-Dip-I, H₆-Sak-Dip-II, H₆-Sak-Dip-I+II, Dip-I, Dip-II, Dip-I+II und H₆-Sak-IEGR in reiner Form isoliert werden (Abb. 4). Mit Ausnahme von H₆-Sak-IEGR unterschieden sich die apparenten Molekulargewichte der Proteine signifikant von den Molmassen, die mit Hilfe des ExPASy aus den entsprechenden Aminosäuresequenzen errechnet wurden (Tab. 3). Mit den in MALDI-TOF-Analysen gemessenen Molmassen und den durch Protein-

sequenzierung bestimmten N-Termini konnte die Identität für die isolierten Proteine bestätigt werden (Tab. 3).

Tab. 3: K_i -Werte und mit verschiedenen Methoden bestimmte Molekulargewichte der gereinigten Proteine.

	Molekulargewichte (Da)		K_i -Werte (pM)
	SDS PAGE (apparent)	MALDI-MS $[M+H]^+$	
H ₆ -Sak-Dip-I	27900	23264	353
Dip-I	11300	6077	78
H ₆ -Sak-Dip-II	28200	23750	>> 353
Dip-II	12300	6576	>> 353
H ₆ -Sak-Dip-I+II	35900	29158	0,91
Dip-I+II	23100	11995	0,78
H ₆ -Sak-IEGR	16700	17175	>> 353
Sak42D	14300	n.b.	n.b.

n.b. = nicht bestimmt

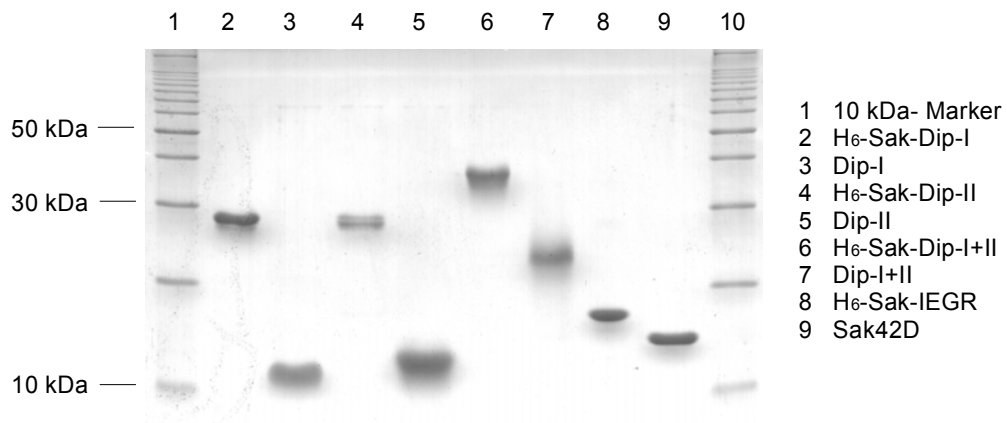


Abb. 4: SDS-PAGE der gereinigten Fusionsproteine und isolierten Dipetalin-Domänen.

Alle Fusionsproteine zeigten zunächst ein 2-Banden-Muster: Durch N-terminale Sequenzanalyse wurde nachgewiesen, dass die obere Bande dem kompletten Protein entsprach, während es sich bei der unteren Bande um das um 10 Amino-

säuren verkürzte N-terminale Prozessierungsprodukt handelte. Die Gründe für diese Prozessierung sind unbekannt. Möglicherweise ist eine bisher nicht identifizierte *E. coli*-Proteinase für diesen gezielten Abbau verantwortlich. Die N-terminal kompletten Fusionsproteine konnten leicht von den prozessierten Formen getrennt werden, da sie im Gegensatz zu letzteren über ihren His-Tag an die Ni-NTA-Säule gebunden und in reiner Form eluiert wurden. Aus 12 g eingesetztem Zellmaterial konnten durchschnittlich ca. 6,8 mg reines Fusionsprotein und 4,9 mg der jeweiligen Dipetalin-Form isoliert werden. Hier wurde nur jeweils die Hälfte der isolierten Fusionsproteinmenge der Faktor Xa-Spaltung und der anschließenden Dipetalin-Isolierung zugeführt.

Der Reinheitsgrad wurde durch densitometrische Auswertung eines 13,75%igen Polyacrylamidgels ermittelt (Abb. 4) und war durchschnittlich > 98%.

4.2. Biochemische und funktionelle Untersuchungen

Nach der Reindarstellung der Fusionsproteine und deren Einzelkomponenten wurden deren biochemischen Eigenschaften und ihre Beeinflussung verschiedener funktioneller Tests untersucht.

4.2.1. Plasminogenaktivierung und fibrinolytische Aktivität

In diesen Experimenten wurden die Plasminogenaktivierung und die fibrinolytische Wirkung für das Sak-Modul als Bestandteil der Fusionsproteine geprüft.

Zunächst wurden die Präparate auf ihre plasminogenaktivierende Wirkung untersucht, indem aus Plasminogen mittels dem chromogenem Plasminsubstrat die Bildung von Plasmin bestimmt wurde. Dabei zeigte sich, dass nicht nur H₆-Sak-IEGR und die Wildtyp-Sak42D plasminogenaktivierend wirksam waren, sondern auch die untersuchten Fusionsproteine eine gleiche Wirkungsstärke entfalteten. Wenn zur Plasminogenaktivierung die Testsubstanzen in einer Konzentration von 100 nM eingesetzt wurden, erreichte die Plasminbildung nach 10 min nahezu das Maximum (Abb. 5). Die anfänglich verzögerte Rate der Plasminbildung (nach 5 min) durch die Fusionsproteine ist gegenüber den Aktivitäten des Wildtyps und der H₆-Sak-IEGR zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant verändert. Die isolierten Dipetalin-Domänen bewirkten keine Plasminogenaktivierung.

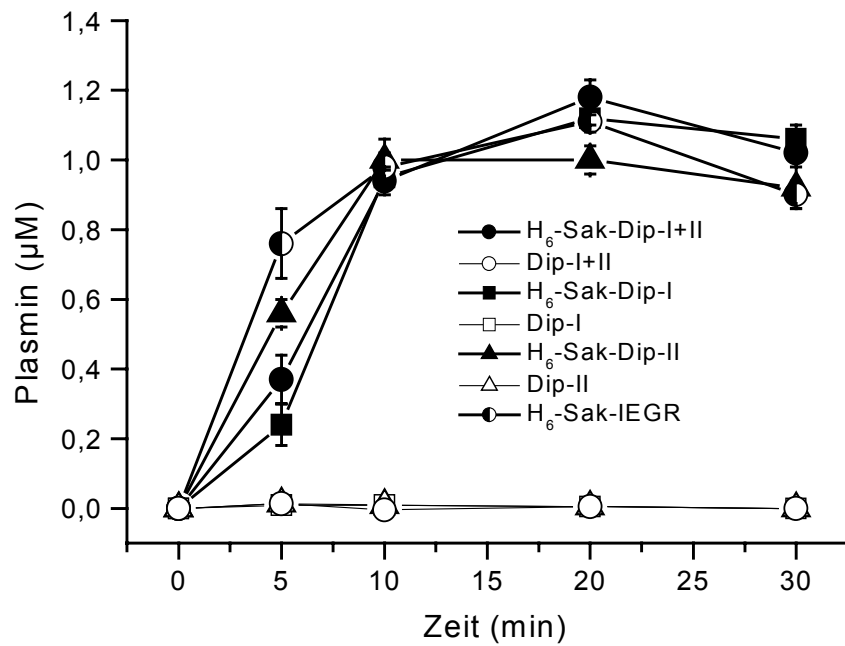


Abb. 5: Bildung von Plasmin aus Plasminogen durch Sak und Fusionsproteine. Das gebildete Plasmin wurde mit chromogenem Plasminsubstrat S-2251 bestimmt. Mittelwerte \pm SEM (n= 5).

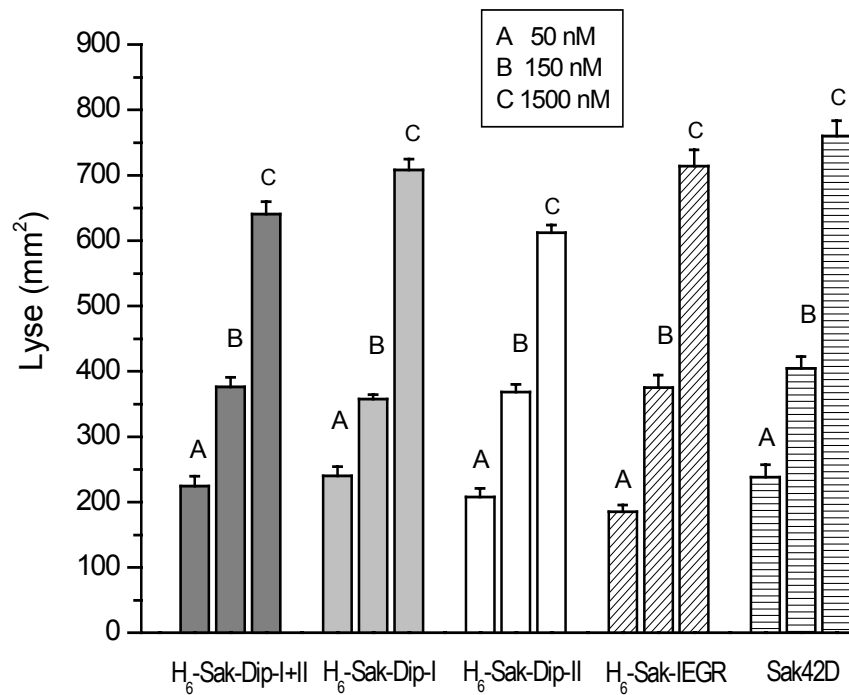


Abb. 6: Fibrinolytische Wirkung der Fusionsproteine im Fibrinplattentest nach 20 h. Mittelwerte \pm SEM (n= 7-9).

Die fibrinolytische Wirkung der Fusionsproteine und der Staphylokinase wurde im Fibrinplattentest bestimmt (Abb. 6). Die Fusionsproteine bewirkten eine konzentrationsabhängige Fibrinolyse und erreichten gleiche Wirkungen wie die Wildtyp-Sak, wenn die Aktivitäten auf molarer Basis verglichen wurden. Signifikante Unterschiede waren dabei nicht nachweisbar. Somit wird durch die Fusionsproteine die fibrinolytische Aktivität der Sak nicht beeinträchtigt.

4.2.2. Hemmung der enzymatischen Thrombinaktivität

Die enzymatische Thrombinaktivität wurde mit chromogenem Thrombinsubstrat S-2238 gemessen. Die Hemmung des Thrombins wurde anhand des verminderten Substratumsatzes durch die Testsubstanzen ermittelt.

Es konnte gezeigt werden, dass nur Dip-I+II und H₆-Sak-Dip-I+II die Thrombinaktivität bei einer Konzentration von 100 pM um > 80% hemmen (Abb. 7). Der Hemmeffekt von Dip-I und H₆-Sak-Dip-I war signifikant schwächer, wobei zwischen beiden Proteinen nochmals differenziert werden muss: Für H₆-Sak-Dip-I ließ sich bei einer Konzentration von 400 pM eine geringere Hemmung der Thrombinaktivität zeigen als für Dip-I (22% gegenüber 45%). Für H₆-Sak-Dip-II, Dip-II und H₆-Sak-IEGR war im untersuchten Konzentrationsbereich von 100 – 400 pM kein signifikanter Hemmeffekt nachweisbar. Wurden Dip-I und Dip-II in gleichen Konzentrationen gemischt, ergab sich keine stärkere Hemmung als für Dip-I allein.

Die errechneten K_i-Werte dienten dem exakten quantitativen Vergleich der Thrombinhemmung und spiegeln die in Abb. 7 dargestellte Hemmung des Thrombins durch die Testsubstanzen wider.

4.2.3. Biacore-Interaktionsanalyse

Mit Hilfe der molekularen Interaktionsanalyse am Biacore™ 2000 können unabhängig von enzymkinetischen Versuchen Aussagen zur Stabilität von Dipetalin-Thrombin-Komplexen getroffen werden. Für die Untersuchungen wurden die Fusionsproteine H₆-Sak-Dip-I, H₆-Sak-Dip-II, H₆-Sak-Dip-I+II und H₆-Sak-IEGR als Kontrolle am Messchip immobilisiert. Das Sak-Modul in den Fusionsproteinen bzw. in H₆-Sak-IEGR dient dabei als Kopplungs- und Abstandselement, während die Interaktion mit dem Analyten Thrombin auf vorhandene und interaktionsfähige Dipetalin-Domänen zurückzuführen ist. Das bestätigen die in Tab. 4 aufgeführten K_D-Werte, die nach Auswertung der Biacore-Sensorgramme berechnet wurden.

Für den Liganden H₆-Sak-IEGR, der keine der Dipetalin-Domänen besitzt, wurde auch keine Wechselwirkung mit Thrombin nachgewiesen ($K_D \gg 10^{-5}$ M). H₆-Sak-Dip-I und H₆-Sak-Dip-I+II interagieren gleichermaßen effektiv mit Thrombin. Dafür sprechen K_D -Werte im pikomolaren Bereich. Die Wechselwirkung der Dip-II-Domäne mit Thrombin ist dagegen wesentlich schwächer; die K_D -Werte liegen im mikromolaren Bereich. Im Vergleich zu den starken Wechselwirkungen der Dip-I- und Dip-I+II-Module ist die Interaktion des Dip-II-Moduls vernachlässigbar.

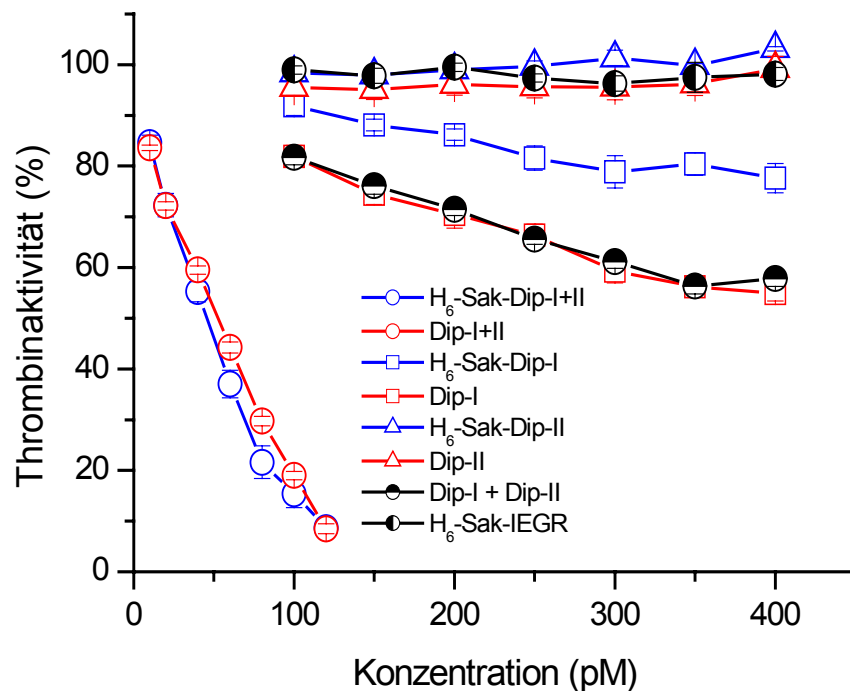


Abb. 7: Hemmung der enzymatischen Thrombinaktivität durch die Testsubstanzen mit Hilfe von chromogenem Substrat S-2238. Mittelwerte \pm SEM ($n = 5$).

Tab. 4: Wechselwirkung von Dipetalin-Domänen mit Thrombin gemessen mit der Biacore-Interaktionsanalyse (K_D -Werte)

	K_D [M]
H ₆ -Sak-Dip-I	$3,7 \times 10^{-11}$
H ₆ -Sak-Dip-I+II	$6,7 \times 10^{-11}$
H ₆ -Sak-Dip-II	$1,3 \times 10^{-5}$
H ₆ -Sak-IEGR	$\gg 10^{-5}$

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Wechselwirkung im natürlich vorkommenden Zweidomänenprotein offensichtlich durch die Dip-I-Domäne vermittelt wird, obwohl in biologischen Tests Dip-I+II mehrfach stärker ist.

4.2.4. Antikoagulatorische Wirkung

Um die antikoagulatorischen Effekte der Dipetalin-Domänen und Fusionsproteine zu bewerten, wurden TT, aPTT und PT gemessen. Hier wird die Hemmung der Thrombinwirkung durch die Verlängerung der Gerinnungszeiten angezeigt.

Wie aus Abb. 8 ersichtlich, bewirkten Dip-I+II und H₆-Sak-Dip-I+II bei Konzentrationen > 10 nM und einer eingesetzten Thrombinkonzentration von 2 U/ml eine signifikante Verlängerung der Thrombinzeit, wobei die hemmende Wirkung von H₆-Sak-Dip-I+II etwas geringer erschien. Dagegen wurden mehr als 10fach höhere Konzentrationen an H₆-Sak-Dip-I bzw. Dip-I benötigt, um die TT signifikant zu verlängern. Bei 500 nM verlängerte sich die TT durch die genannten Proteine von 19 s auf 72 s (H₆-Sak-Dip-I) bzw. 61 s (Dip-I). Anders als beim enzymatischen Thrombininhibitionstest mit dem synthetischen Thrombinsubstrat S-2238 (s.o.) waren hier keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Proteinen in der Verlängerung der TT erkennbar. Dip-II und H₆-Sak-Dip-II haben einen sehr geringen Einfluss auf die TT: Diese Proteine müssen in Konzentrationen > 1 µM eingesetzt werden, um eine Verlängerung der Thrombinzeit zu erzielen. Der Effekt der H₆-Sak-IEGR auf die TT war bei vergleichsweise hohen Konzentrationen vernachlässigbar.

Die Veränderung der aPTT in Gegenwart von Dipetalinen und den zugehörigen Fusionsproteinen ist in Abb. 9 dargestellt. Auch hier waren Dip-I+II und H₆-Sak-Dip-I+II die stärksten Hemmstoffe der Gerinnung, die eine Verlängerung der aPTT zeigten. Im Konzentrationsbereich von 400 nM bis 10000 nM wirkten Dip-I, Dip-II und die entsprechenden Fusionsproteine gleichermaßen antikoagulatorisch. Verglichen mit den antikoagulatorischen Effekten von Dip-I+II und H₆-Sak-Dip-I+II zeigen diese Proteine signifikant geringere Effekte. Diese Ergebnisse untermauern die thrombininhibitorische Wirkung speziell von H₆-Sak-Dip-I+II und Dip-I+II.

Wie aus Abb. 10 hervorgeht, wurde eine signifikante Verlängerung der PT nur in Gegenwart von Dip-I+II und H₆-Sak-Dip-I+II gemessen. Dafür waren Konzentrationen von mindestens 300 nM notwendig. Die Hemmung durch Dip-I und durch das entsprechende Fusionsprotein war schwächer, aber ab einer

das entsprechende Fusionsprotein war schwächer, aber ab einer Konzentration von 9000 nM statistisch signifikant. Dip-II hemmte Thrombin nicht.

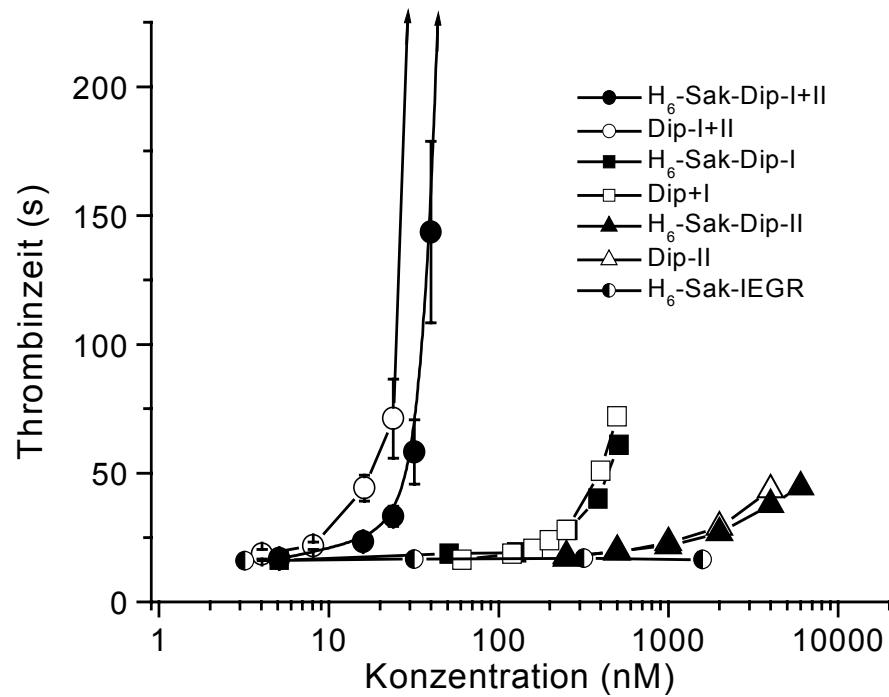


Abb. 8: Einfluss von Dipetalin-Domänen und ihren zugehörigen Fusionsproteinen auf die plasmatische Gerinnung. Bestimmung der Thrombinzeit. Mittelwerte \pm SEM ($n = 4 - 8$).

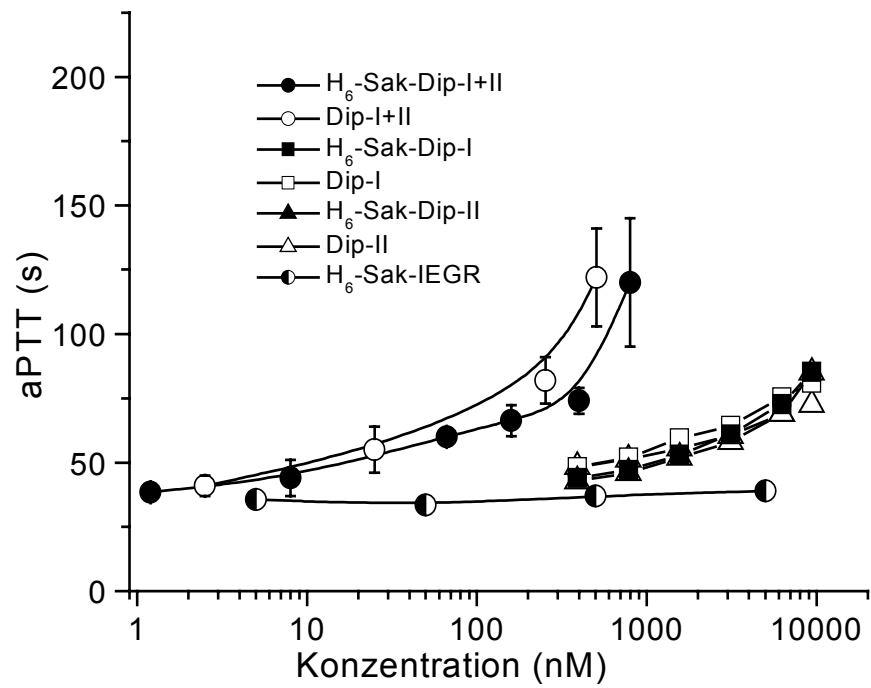


Abb. 9: Einfluss von Dipetalin-Domänen und ihren zugehörigen Fusionsproteinen auf die plasmatische Gerinnung. Bestimmung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit. Mittelwerte \pm SEM (n = 4 - 8).

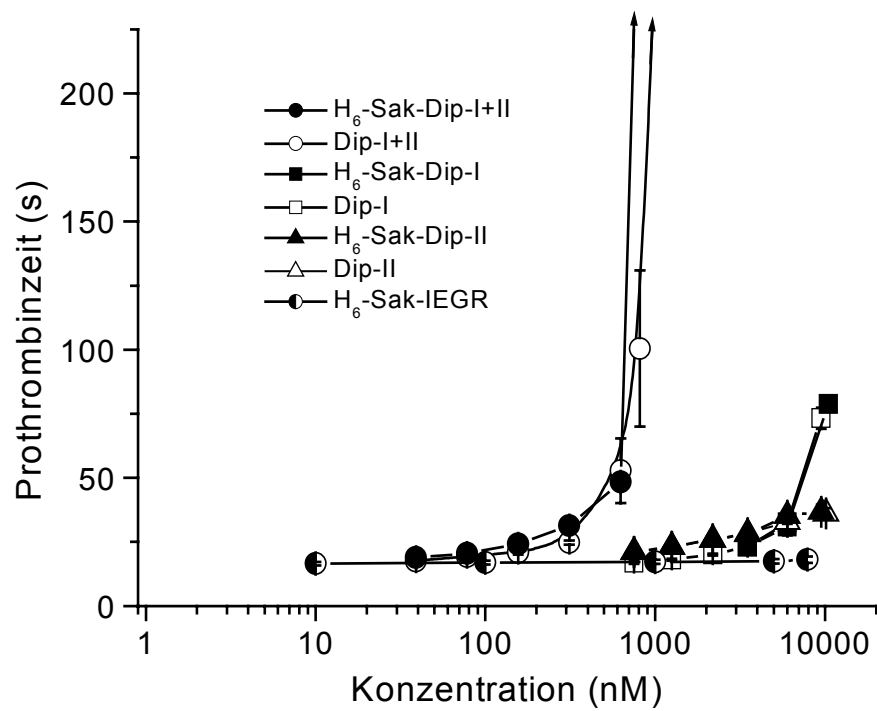


Abb. 10: Einfluss von Dipetalin-Domänen und ihren zugehörigen Fusionsproteinen auf die plasmatische Gerinnung. Bestimmung der Prothrombinzeit. Mittelwerte \pm SEM (n = 4).

Es kann geschlussfolgert werden, dass Dip-I+II und H₆-Sak-Dip-I+II sowohl in den enzymatischen Thrombininhibitionstests als auch in den Koagulationstests die stärksten Hemmeffekte zeigten. In allen Koagulationstests hatte H₆-Sak-IEGR keinen Einfluss auf die plasmatische Gerinnung, sie kann als Kontrolle angesehen werden.

4.2.5. Hemmung der Plättchenaggregation

Thrombin ist der wirksamste Plättchenaktivator, indem es den "protease activated receptor" (PAR)-1 und in höheren Konzentrationen PAR-4 der Plättchen aktiviert. Thrombin bei einer Konzentration von 0,1 E/ml (entspricht etwa 1 nM) bewirkt eine Aggregation menschlicher Plättchen, welche durch Thrombininhibitoren oder durch Thrombinrezeptorantagonisten blockiert werden kann. Als stärkste Hemmstoffe der thrombininduzierten Plättchenaggregation erwiesen sich Dip-I+II und H₆-Sak-Dip-I+II (Abb. 11). Bereits bei einer Konzentration von 1 nM wurde ein signifikanter Hemmeffekt erreicht. Etwa 20fach höhere Konzentrationen sind erforderlich, um gleiche Hemmeffekte durch Dip-I und H₆-Sak-Dip-I zu erreichen. Durch Dip-II und H₆-Sak-Dip-II konnte bei vergleichsweise hohen Konzentrationen kein signifikanter Hemmeffekt der thrombininduzierten Plättchenaggregation erreicht werden. Ein hemmender Einfluss auf die ADP- und Kollagen-induzierte Aggregation humaner Plättchen war bis zu einer Konzentration der Fusionsproteine von 14 000 nM nicht nachweisbar.

4.2.6. Vaskuläre Effekte

Thrombinrezeptoren (PAR 1) sind sowohl auf Endothelzellen als auch auf glatten Muskelzellen zahlreicher Gefäße nachgewiesen worden. An isolierten Gefäßen mit intaktem Endothel bewirkt Thrombin eine endothelabhängige Relaxation, die über eine Freisetzung des endothelialen NO vermittelt wird (Glusa 1994). Im folgenden wurde geprüft, ob Dipetalin und die Fusionsproteine diese rezeptorvermittelten Thrombineffekte beeinflussen. Kleine Gefäßringe der Arteria pulmonalis vom Schwein wurden mit PGF_{2α} vokontrahiert. Wenn sich das Kontraktionsplateau eingestellt hatte, wurde Thrombin dem Organbad zugesetzt. Bei intaktem Endothel bewirkte Thrombin bei einer Konzentration von 0,1 E/ml eine Relaxation der vokontrahierten Gefäße um $83 \pm 5\%$ (n = 20). Die Fusionsproteine bzw. Dipe-

taline-Domänen wurden 5 min vor der Zugabe von Thrombin dem Organbad zugesetzt. Wie in Abb. 12 gezeigt, erwiesen sich Dip-I+II und H₆-Sak-Dip-I+II als potente Inhibitoren der vaskulären Thrombineffekte. Auch Dip-I und H₆-Sak-Dip-I hemmten die thrombininduzierte Relaxation, jedoch waren 10fach höhere Konzentrationen erforderlich, um einen signifikanten Hemmeffekt zu erreichen. Im Gegensatz dazu wurde durch Dip-II und H₆-Sak-Dip-II sowie H₆-Sak-IEGR keine Hemmung der Relaxation erreicht. Da für die Plättchenaggregation und die Relaxation gleiche Thrombinkonzentrationen eingesetzt wurden, ergaben sich hinsichtlich der Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Hemmung der zellulären Effekte nahezu identische Resultate.

Die vorliegenden Experimente sprechen dafür, dass durch Dip-I+II und das entsprechende Fusionsprotein über die Hemmung der proteolytischen Aktivität des Thrombins die zellulären Effekte des Enzyms verhindert werden.

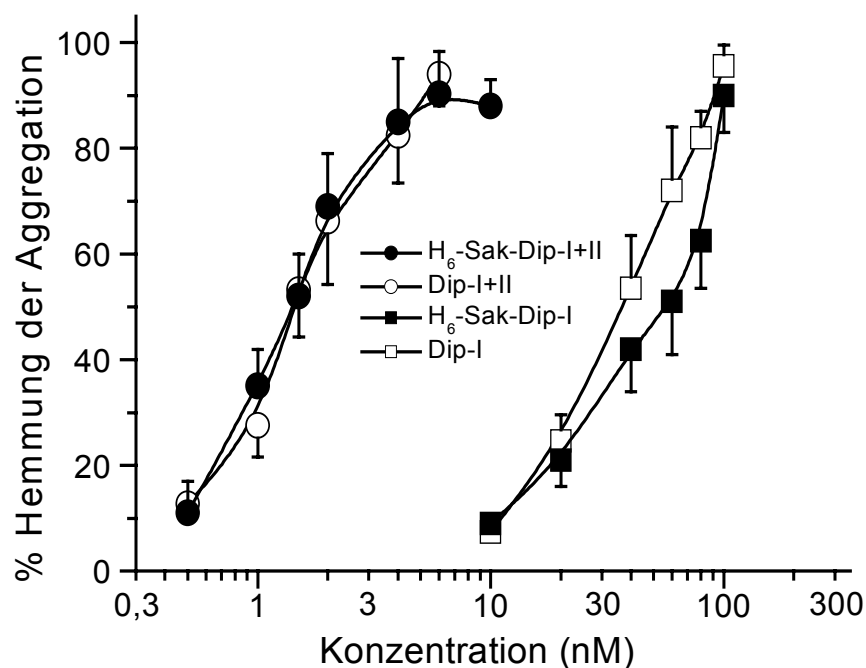


Abb. 11: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Hemmung der Thrombin (0,1 U/ml) - induzierten Aggregation an gewaschenen humanen Thrombozyten. Mittelwert \pm SEM; n = 4 - 5.

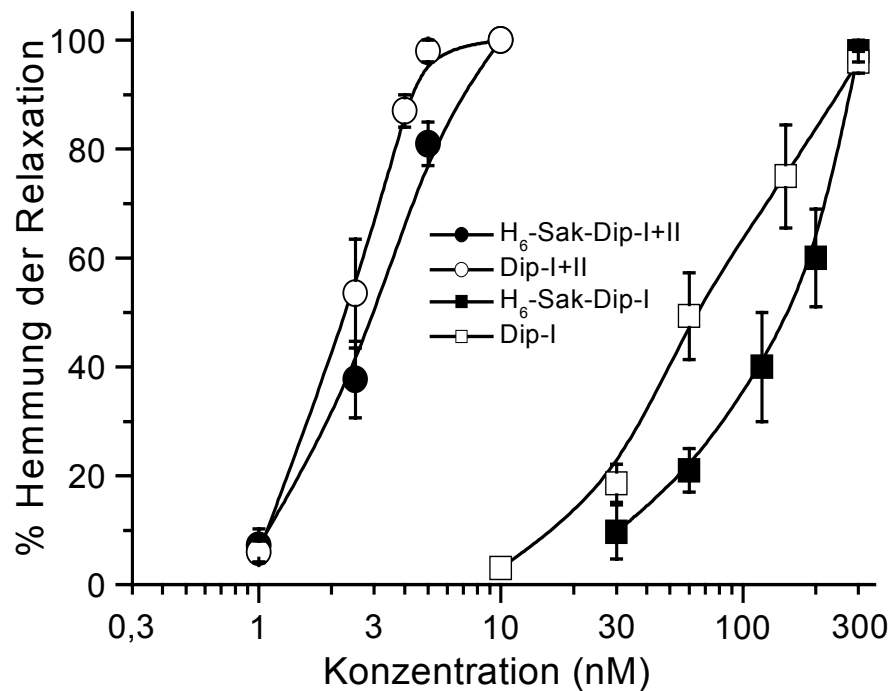


Abb. 12: Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die Hemmung der Thrombin (0,1 U/ml) - induzierten endothelabhängigen Relaxation an PGF_{2α}- vorkontrahierten Schweinelungenarterien. Mittelwert ± SEM; n = 5.

5. Diskussion

Zur Behandlung thromboembolischer Erkrankungen, wie z.B. akutes Koronarsyndrom, Myokardinfarkt, Lungenembolie, Schlaganfall oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit und deren Folgen stehen neben invasiven Methoden wie der PTCA Medikamente zur Verfügung, welche die Gerinnsellyse bewirken. Das erhöhte prokoagulatorische Potential bei Patienten mit thromboembolischen Erkrankungen schränkt aber häufig die Effektivität der thrombolytischen Therapie ein (Merlini *et al.* 1995). Ein aktiviertes Gerinnungssystem kann zu einer frühzeitigen Reokklusion selbst nach vorangegangener erfolgreicher Lysetherapie führen (Granger *et al.* 1992, Ohman *et al.* 1990). Zur Verhinderung eines erneuten thrombotischen Gefäßverschlusses werden deshalb zusätzlich antikoagulatorisch wirkende Medikamente eingesetzt (Collen & Lijnen 1995).

Zur simultanen thrombolytischen und antikoagulatorischen Therapie thromboembolischer Erkrankungen wären zwei in einem Präparat vereinte Wirkprinzi-

prien wünschenswert. Der effektivste Weg ist die Herstellung von Hybridmolekülen mit fibrinolytischen und antikoagulatorischen Eigenschaften. Die dafür ursprüngliche Methode ist die chemische Quervernetzung mehrerer Komponenten. Da sie meistens ungerichtet verläuft, d.h. unterschiedliche Molekülteile willkürlich miteinander konjugiert werden, ist die Ausbeute an tatsächlich bi- oder multifunktional aktiven Produkten häufig sehr gering (Phaneuf *et al.* 1994). Falls es sich bei den zu koppelnden Wirkstoffen um Peptide oder Proteine handelt, stehen heute neben der chemischen Kopplung gentechnische Herstellungsverfahren zur Verfügung. Da man bei diesen Verfahren Gene fusioniert, ist die Bezeichnung Fusionsproteine für die Produkte üblich.

In der Vergangenheit gab es mehrere Versuche zur Herstellung von Fusionsproteinen mit o.g. Wirkprofilen. Im Folgenden werden nur jene Konstruktionen von Fusionsproteinen berücksichtigt, die Sak als plasminogenaktivierendes bzw. fibrinolytisch aktives Modul enthielten. Van Zyl *et al.* (1997) entwickelten das Fusionsprotein PLATSAK (**P**latelet-**A**ntithrombin-**S**taphylokinase). Neben Sak in N-terminaler Position enthält es in Richtung C-Terminus orientiert das RGD-Peptid, welches die Bindung von Plättchen über den Glykoprotein IIb/IIIa-Membranrezeptor an Fibrinogen inhibieren sollte, die Aminosäurereste 8-16 von Fibrinopeptid A, welche im katalytischen Zentrum von Thrombin binden sollten (Martin *et al.* 1992) und die "anion-binding exosite" - Domäne (Aminosäurereste 54-65) des Hirudins, ebenfalls mit thrombinhemmender Funktion (Markwardt *et al.* 1970). Szarka *et al.* (1999) fusionierten die Hirudin-Variante 1 (HV1; Aminosäuren 1 - 63 des Hirudins) (Dodt *et al.* 1984) sowohl C- als auch N-terminal an Sak. Szemraj *et al.* (2001) erzeugten das Fusionsprotein mit der größten Molmasse, wobei Sak in der Mitte N-terminal nach dem zweiten von insgesamt vier Modulen eingefügt wurde: RGD-Peptid, Kringle-2-Domäne (K2) des t-PA, Sak und Hirudin.

Die kritische Bewertung und der Vergleich mit den eigenen experimentellen Daten lässt die Defizite der genannten Arbeiten erkennen. Das betrifft einerseits die Auswahl und Anzahl der zu verknüpfenden Module, andererseits sind die Expressionsausbeuten sowie die Effizienz und Qualität der Proteinreinigung unvollständig dargestellt. Ebenso fehlen wirklich überzeugende Nachweise zur biologischen Wirkung der Fusionsproteine.

Interessant ist, dass Szarka *et al.* (1999) für die Expression ihrer Fusionsproteine HV1-Sak und Sak-HV1 ein *Bacillus subtilis*-Expressionssystem wählten. Der

Vorzug dieses Expressionssystems ist die eher problemlose Sekretion des Zielproteins in das Kulturmedium. Verglichen mit einem *E. coli*-Zellaufschluss ist der Gehalt an Fremdproteinen gering, was von Vorteil für die Proteinreinigung sein kann. Allerdings wird das *B. subtilis*-Expressionssystem selten benutzt, da neben dem Zielprotein gleichzeitig erhebliche Mengen an Proteasen ins Kulturmedium sezerniert werden, welche die unkontrollierte Prozessierung des Zielproteins bewirken können. Diese Annahme wird durch frühere Erfahrungen bei der Sak-Expression in *B. subtilis* unterstützt (Behnke & Gerlach 1987). Aussagen zur Qualität der Proteinreinigung fehlen in den oben genannten Arbeiten. Die dargestellten Reinigungsmethoden lassen nicht erkennen, dass ein mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Proteinen vergleichbarer Reinheitsgrad erreicht werden konnte. In der Arbeit von van Zyl *et al.* sind nach der Reinigung über die Ni-NTA-Agarose-Säule keine weiteren Proteinreinigungsschritte angegeben. Zusätzlich entsteht der Eindruck, dass diese Autoren eine sehr willkürliche Verknüpfung einzelner Module vornahmen mit dem Wunsch, möglichst viele Funktionsprinzipien im Fusionsprotein zu vereinen. Rationale Ansätze, wie die Berücksichtigung von Proteinstrukturdaten, sind nicht erkennbar. So ist fraglich, ob zumindest kurze Peptide (RGD-Modul) im gefalteten Fusionsprotein-Molekül überhaupt funktionell wirksam ausgerichtet sind.

Die erwähnten Arbeiten zu Fusionsproteinen unter Einbeziehung von Sak vermitteln einen unvollständigen Eindruck zur Bifunktionalität der jeweiligen Konstrukte. Szarka *et al.* (1999) wiesen die plasminogenaktivierende Funktion des Fusionsproteins HV1-Sak qualitativ (SDS-PAGE) nach, trafen aber keine quantitative Aussage. Die antikoagulatorische Wirkung des Hirudin-Moduls wurde nicht getestet. Das von Szemraj *et al.* (2001) beschriebene Fusionsprotein RGD/K2/STA/HIR aktivierte Plasminogen und war auch unter quantitativem Gesichtspunkt mit der Wildtyp-Sak vergleichbar. Es war fibrinolytisch aktiv, wobei der hier genutzte Mikro-Gerinnsel-Lyse-Test (MCLA) nach Lewis (1991) nicht die Sensitivität und Reproduzierbarkeit des in der vorliegenden Arbeit benutzten Fibrinplattentests besitzt. Die Thrombinhemmung durch das Hirudin-Modul war dagegen zweifach niedriger als die des Hirudins allein. Daten zur Wirksamkeit von RGD-Peptid und Kringle-Polypeptid wurden nicht vorgestellt. Das Einfügen der Kringle-Domäne zur Vermittlung einer Fibrinspezifität ist ohnehin nicht notwendig, denn Collen *et al.*

(1993) wiesen nach, dass die fibrinolytische Wirkung der Sak in vivo fibrinspezifisch ist.

Das Fusionsprotein PLATSAK (van Zyl *et al.* 1997) musste mit ca. 400-fach höherer Konzentration eingesetzt werden, um die von uns mit H₆-Sak-Dip-I+II und Dip-I+II erreichte Verlängerung der TT zu erzielen. Für die Verlängerung der aPTT durch PLATSAK waren ebenfalls deutlich höhere Konzentrationen erforderlich. Ein hemmender Einfluss auf die thrombininduzierte Plättchenaggregation durch PLATSAK wurde nicht erwähnt. Die Wirkung der RGD-Sequenz konnte nicht bewiesen werden. Dagegen war die fibrinolytische Aktivität, gemessen mit dem Thrombelastographen, gegenüber der Wildtyp-Sak unverändert.

Mit durchschnittlich 17% Anteil am Gesamtproteingehalt der *E. coli*-Zellen erreichten wir Expressionsausbeuten, die auch für angewandte Fragestellungen akzeptabel sind, wie z.B. die biotechnologische Herstellung der Fusionsproteine. Das Sak-Modul wurde in den Fusionsproteinen N-terminal platziert und am N-Terminus mit einem His-Tag ausgestattet. Diese Lösung wurde gewählt, da aus früheren Untersuchungen folgende Aspekte bekannt waren:

- Die entsprechende Positionierung des *sak*-Gens mit seinen Promotorsequenzen im Expressionsplasmid steigert die Expression fusionierter Proteine und Peptide deutlich (Schlott *et al.* 1998).
- Der angefügte His-Tag verbessert die Effizienz besonders der Primärreinigungsschritte, siehe auch Janknecht *et al.* (1991).
- Die N-terminal durch den His-Tag verlängerte Sak und eine N-terminale Prozessierung der Staphylokinase (bis zum Abbau von 16 Aminosäuren inkl. His-Tag) führen nicht zur Beeinträchtigung der Funktion.
- Die Verlängerung der Sak am C-Terminus führt nicht zum Verlust der plasminogenaktivierenden Funktion (Gase *et al.* 1996).

Die Proteinstruktur der Sak war in eigenen Untersuchungen aufgeklärt worden (Ohlenschläger *et al.* 1997, 1998). Sak ist ein kompakt gefaltetes globuläres Protein (Abb. 13). Ebenso war vor Beginn dieser Versuche die Struktur der Dip-I-Domäne des Dipetalins aufgeklärt (Schlott *et al.* in Druck). Die Lösung der Raumstruktur des kompletten Dip-I+II wird von Ohlenschläger *et al.* vorbereitet. Klar ist, dass beide Domänen über ein flexibles Linkerpeptid verbunden sind, das eine wenig eingeschränkte, voneinander unabhängige Beweglichkeit beider Domänen gewährleistet. Die Kopplung der Sak und Dip-Module erfolgte über das die FXa-

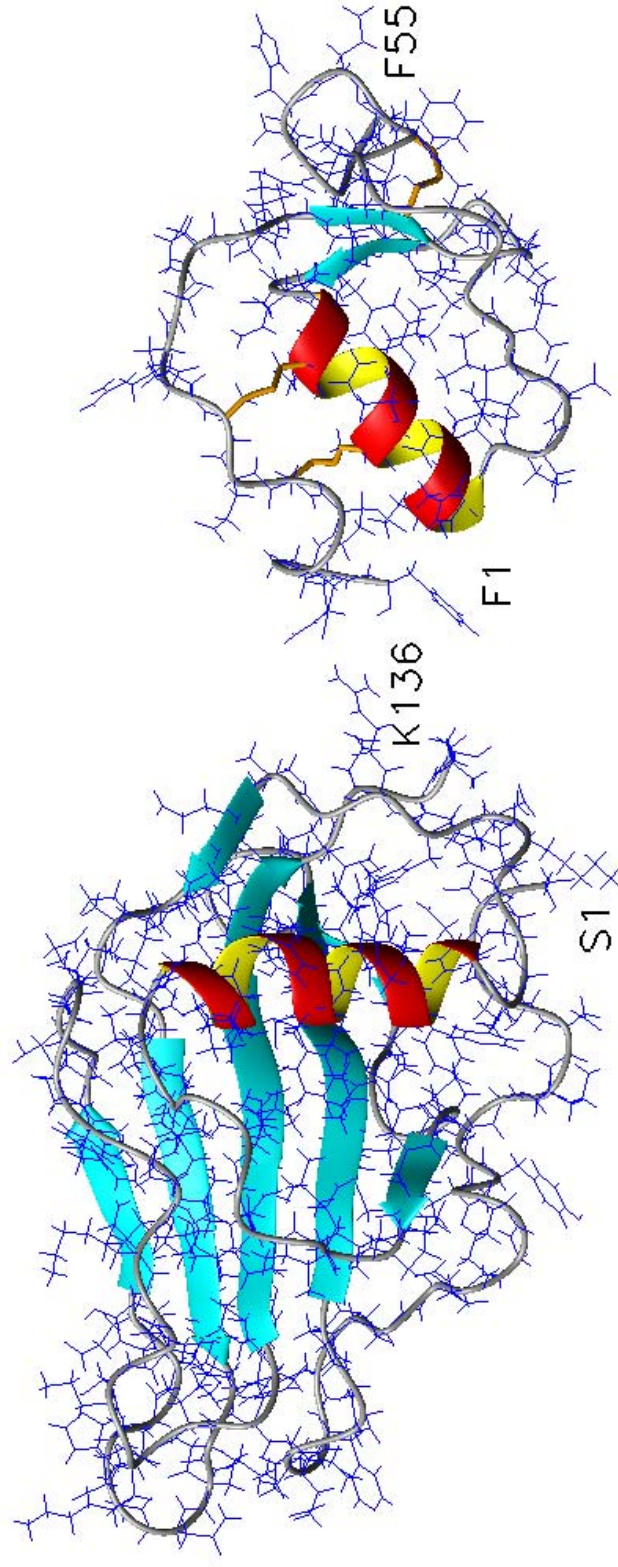


Abb. 13: NMR-Lösungsstruktur von Staphylokinase (S1-K136) (Ohlenschläger *et al.* 1998) und der ersten Domäne des Dipetalins (F1-F55) (Schlott *et al.* in Druck). Die Sekundärstrukturelemente α -Helix (rot-gelb) und β -Faltblatt (cyan) sind zusätzlich hervorgehoben. Disulfidbrücken im Dipetalin-I sind orange gefärbt. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programms MOLMOL erstellt (Koradi *et al.* 1996).

Schnittstelle enthaltende Linkerpeptid, welches in Lösung frei zugänglich ist. Das lässt sich aus der Effektivität der FXa-Spaltung als Vorstufe zur Isolierung beider Fusionsmodule ableiten. NMR-Untersuchungen ergaben zudem, dass keine die Bifunktionalität einschränkende intra- (z.B. zwischen den Dip-Domänen) und intermodularen (zwischen Sak- und Dip-Modul) Wechselwirkungen im H₆-Sak-Dip-I+II-Molekül vorliegen: Die Auswertung der [¹H-¹⁵N]-HSQC-Spektren der Fusionsproteine im Vergleich zu den Spektren von Sak (Ohlenschläger *et al.* 1997) und Dip-I (Schlott *et al.* in Druck) zeigte, dass die Module in den Fusionsproteinen die gleiche globuläre Faltung aufwiesen wie im „nativen“, nicht fusionierten Zustand. Funktionell signifikante Molekülregionen in den Sak- und Dip-Modulen waren nicht von den nachgewiesenen Molekülkontakten betroffen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die den ursprünglichen Modulen Staphylokinase und Dipetalin innewohnenden Eigenschaften in Fusionsproteinen uneingeschränkt erhalten bleiben und dass die bifunktionalen Eigenschaften vergleichbar mit denen der Einzelmodule sind. Die plasminogenaktivierende Wirkung ist von der des H₆-Sak-IEGR-Einzelmoduls und von der des Wildtyp-Sak42D nicht verschieden. Gleiches gilt für die fibrinolytische Aktivität des Fusionsproteins im Vergleich zum Einzelmodul. Das wurde im Fibrinplattentest gezeigt, der als Referenztest zum Vergleich fibrinolytischer Aktivitäten angesehen wird (Hauptmann *et al.* 1995). Des weiteren vermag das Dip-I+II-Modul die Serinprotease Plasmin nicht zu hemmen, denn zumindest Spuren des aktiven Enzyms werden benötigt, um die Plasminogenaktivierung durch Sak zu starten (Collen *et al.* 1993).

Die thrombinhemmende Funktion des H₆-Sak-DipI+II ist ebenfalls uneingeschränkt nachweisbar, wenn mit dem Dipetalin-Modul Dip-I+II und anderen Thrombininhibitoren, wie Hirudin (Markwardt 1994b), Rhodniin (van de Locht *et al.* 1995, 1996) und Triabin (Noeske-Jungblut *et al.* 1995, Glusa *et al.* 1997, Fuentes-Prior *et al.* 1997) verglichen wird. Die hohe Affinität dieses Fusionsproteins zum Thrombin zeigt sich auch bei der Bestimmung der K_D-Werte, die im pikomolaren Bereich liegen. In enzymkinetischen Tests erwiesen sich H₆-Sak-DipI+II und Dip-I+II als „tight-binding“-Inhibitoren des Thrombins mit K_i-Werten im femtomolaren Bereich. Darüber hinaus belegen die komplexen Koagulationstests die effiziente Hemmung der plasmatischen Gerinnung durch die Fusionsproteine. Die antikoagulatorischen Effekte von H₆-Sak-Dip-I+II und Dip-I+II lagen in demselben Kon-

zentrationen wie für Hirudin. In unseren Experimenten war die Bestimmung der Thrombinzeit der empfindlichste Gerinnungstest, denn schon bei Konzentrationen über 10 nM konnte eine signifikante Verlängerung der TT durch H₆-Sak-Dip-I+II und Dip-I+II erreicht werden. Dagegen waren höhere Konzentrationen dieser Proteine erforderlich, um die aPTT oder die PT zu verlängern. Ein Einfluss auf die Faktor Xa- Aktivität ist nicht anzunehmen, denn die Spaltung der Fusionsproteine im Rahmen der Proteinpräparation wurde durch die Anwesenheit des Dip-I+II-Moduls nicht behindert.

Es konnte gezeigt werden, dass Dip-I+II und gleichermaßen das entsprechende Fusionsprotein effizient zelluläre Effekte des Thrombins hemmen. Thrombin ist der wirksamste Agonist für die Plättchenaktivierung, und als Folge der Stimulation von Protease-aktivierenden Rezeptoren (PAR) bewirkt es bei sehr geringen Konzentrationen die Aggregation von humanen Plättchen (Glusa 1992). Diese wurde durch H₆-Sak-Dip-I+II und Dip-I+II in derselben Größenordnung gehemmt wie durch Hirudin (Glusa 1991) oder Triabin (Noeske-Jungblut *et al.* 1994, Glusa *et al.* 1997). Die ebenfalls PAR-Rezeptor-vermittelte, endothelabhängige Relaxation isolierter Gefäßringe wurde durch H₆-Sak-Dip-I+II und Dip-I+II mit der gleichen Wirksamkeit gehemmt wie die Plättchenaggregation. Wenn Thrombin in einer Konzentration von 1 nM eingesetzt wurde, ließ sich mit ca. 2 nM H₆-Sak-Dip-I+II eine 50%ige Hemmung der zellulären Effekte des Thrombins erreichen. In isolierten Systemen aus Fibrinogen, Thrombin und Testsubstanz lässt sich ein exaktes stöchiometrisches Verhältnis der Thrombinhemmung nachweisen.

In der vorliegenden Arbeit konnte klar gezeigt werden, dass der ersten Domäne des Dipetalins bei der Interaktion mit Thrombin eine Schlüsselfunktion zukommt, was durch die Thrombintests unterstrichen wurde.

Die ermittelten Dissoziationskonstanten K_D für die Wechselwirkungen mit Thrombin ergaben auch für H₆-Sak-Dip-I Werte im pikomolaren Bereich, was für eine hohe Affinität zum Thrombin spricht. Für H₆-Sak-Dip-II und H₆-Sak-IEGR (Negativkontrolle) wurden dagegen hohe K_D -Werte ermittelt, die auf eine zu vernachlässigende Wechselwirkung mit Thrombin schließen lassen. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Dip-II-Domäne nicht mit der „anion-binding exosite“ des Thrombins interagiert, wie von van de Locht *et al.* (1995) für die homologe Domäne des Rhodniins vermutet wurde.

Thrombin wird im Test mit dem Thrombinsubstrat S-2238 durch H₆-Sak-Dip-I und Dip-I signifikant gehemmt, allerdings in höheren Konzentrationen als durch H₆-Sak-Dip-I+II und Dip-I+II. H₆-Sak-Dip-II, Dip-II und H₆-Sak-IEGR hemmen Thrombin nicht. Der isolierten Domäne-II konnte somit keine biologische Aktivität zugewiesen werden. Das äquimolare Gemisch aus Dip-I und Dip-II übertrifft nicht die thrombinhemmende Wirkung von Dip-I. In funktioneller Hinsicht ergänzen sich die einzelnen Domänen I und II des Dipetalins einander nicht. Deshalb scheint Dip-II nur dann für eine optimale Thrombinhemmung von Bedeutung zu sein, wenn es über das flexible Linkerpeptid mit der Domäne Dip-I verbunden ist (Schlott *et al.* in Druck).

Sowohl die Ergebnisse zur antikoagulatorischen Wirkung als auch die zur Hemmung zellulärer Thrombineffekte spiegeln die Rangfolge der thrombinhemmenden Wirkung der Einzeldomänen wider: Dip-I und H₆-Sak-Dip-I hemmen schwächer als die Zweidomänenvarianten. Dip-II und H₆-Sak-Dip-II sind praktisch inaktiv (Schlott *et al.* in Druck).

Die „assistierende“ Funktion der Domäne Dip-II und des Linkerbereichs werden Gegenstand weiterer Untersuchungen bleiben. Das Hauptinteresse wird sich aber auf die gentechnologische Veränderung der Dip-Domäne-I speziell des C-Terminus richten mit dem Ziel, eine dem Zweidomänenprotein vergleichbare Hemmung für Thrombin zu erreichen. Da die plasminogenaktivierenden und fibrinolytischen Potenzen im Fusionsprotein offenbar nicht von der Konstruktion des Dip-Moduls abhängig sind, ergäbe sich die Möglichkeit, die Molekülgröße der bifunktionalen Fusionsproteine zu reduzieren. Ziel ist die Konstruktion „maßgeschneiderter“ Fusionsproteine mit kleinerem Molekulargewicht, die im Anschluss an Expression, Reinigung und Funktionsuntersuchungen als potentielle Antithrombotika von Interesse sind.

Die Kombination einer plasminogenaktivierenden und einer thrombinhemmenden Wirkung in einem in hohen Ausbeuten produzierbaren rekombinanten Fusionsprotein stellt ein mögliches Wirkprinzip dar, das für die medikamentöse Therapie erfolgversprechend sein könnte. Das wird jedoch entscheidend von den weiteren Ergebnissen physiologischer und pharmakologischer Untersuchungen abhängen.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die pharmakologische Untersuchung an Fusionsproteinen bestehend aus Staphylokinase und verschiedenen Dipetalin-Domänen mit gerinnungshemmenden und profibrinolytischen Eigenschaften.

Zur Anzucht der Fusionsproteine H₆-Sak-Dip-I, H₆-Sak-Dip-II und H₆-Sak-Dip-I+II wurde ein *E. coli*-Expressionssystem verwendet, in welchem diese intrazellulär und in gelöster Form vorlagen. Mit chromatographischen Verfahren konnten die Proteine in einem fünfstufigen Präparationsverfahren bis zur Homogenität gereinigt werden.

In einem enzymatischen Thrombinhemmungstest mit chromogenem Substrat S-2238 erwiesen sich Dip-I+II und H₆-Sak-Dip-I+II als potente Thrombininhibitoren, während Dip-I und H₆-Sak-Dip-I eine signifikant geringere Hemmwirkung zeigten. Mit einem Gemisch aus Dip-I und Dip-II konnten die thrombinhemmenden Effekte von Dip-I+II nicht erreicht werden, sondern die Effekte blieben hinter denen von Dip-I zurück. Die Proteine Dip-II, H₆-Sak-Dip-II und H₆-Sak-IEGR hatten keinen Einfluss auf die proteolytische Thrombinwirkung. Weiterhin scheint Dip-II nur dann für die Hemmung von Thrombin wichtig zu sein, wenn es über ein flexibles Linkerpeptid mit Dip-I verbunden ist.

Die antikoagulatorische Wirkung der Präparate wurde mit den globalen Gerinnungstests Thrombinzeit (TT), aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) und Prothrombinzeit (PT) bestimmt. Eine signifikante Verlängerung der TT konnte durch Dip-I+II und H₆-Sak-Dip-I+II mit Konzentrationen > 10 nM erreicht werden. Mehr als 10fach höhere Konzentrationen von Dip-I und H₆-Sak-Dip-I wurden benötigt, um die TT signifikant zu verlängern. Dip-II und H₆-Sak-Dip-II hatten einen sehr geringen Einfluss auf die TT, denn Konzentrationen größer als 1 µM waren erforderlich, um eine signifikante Verlängerung zu erzielen. Der Effekt von H₆-Sak-IEGR war zu vernachlässigen. Das Ausmaß der TT-Verlängerung durch die untersuchten Proteine korrelierte mit deren zugehörigen K_i-Werten.

Die thrombinhemmende Wirkung von Dip-I+II und H₆-Sak-Dip-I+II zeigte sich auch in der Verlängerung der aPTT. Im Gegensatz dazu erzielten Dip-I und Dip-II sowie ihre zugehörigen Fusionsproteine signifikant schwächere antikoagulatorische Effekte. H₆-Sak-IEGR hatte auf die aPTT keinen Einfluss.

Die PT wurde lediglich durch Dip-I+II und H₆-Sak-Dip-I+II signifikant verlängert. Dafür waren Konzentrationen über 300 nM erforderlich.

Darüber hinaus vermochten Dip-I+II und H₆-Sak-Dip-I+II die thrombininduzierte Plättchenaggregation signifikant zu hemmen. Ein signifikanter Hemmeffekt wurde bereits bei Konzentrationen von 1 nM erzielt, wohingegen 20fach höhere Konzentrationen von Dip-I und H₆-Sak-Dip-I erforderlich waren, um gleiche Hemmeffekte zu erreichen. Wie in den vorangegangenen Untersuchungen hemmten Dip-II und H₆-Sak-Dip-II die Plättchenaggregation nicht. Die untersuchten Proteine hatten keinen Einfluss auf die ADP- und Kollagen-induzierte Plättchenaggregation.

Die thrombinbedingte endotheliumabhängige Relaxation an isolierten Ringen der A. pulmonalis vom Schwein wurde durch Dip-I+II und H₆-Sak-Dip-I+II mit derselben Effektivität gehemmt wie die Plättchenaggregation. Ähnliche Ergebnisse wurden mit Dip-I und H₆-Sak-Dip-I erzielt. Dip-II und H₆-Sak-Dip-II waren nicht inhibitorisch wirksam.

Desweiteren wurden die plasminogenaktivierende und die fibrinolytische Wirksamkeit der Proteine geprüft. Alle Fusionsproteine zeigten eine plasminogenaktivierende Wirkung, die mit der der Wildtyp-Sak und der H₆-Sak-IEGR vergleichbar war. Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich im untersuchten Zeitraum von 0-30 s nicht. Im Gegensatz zu den Fusionsproteinen waren die einzelnen Dipetalin-Domänen inaktiv. Darüber hinaus wurde die fibrinolytische Aktivität mit Hilfe des Fibrinplattentests untersucht. Die Fusionsproteine führten zu einer konzentrationsabhängigen Fibrinolyse. Nach 20 Stunden unterschieden sich die Lysehöfe nicht statistisch signifikant von denen durch Sak42D und H₆-Sak-IEGR ausgelösten Fibrinolyseflächen. Demzufolge wird die fibrinolytische Aktivität der Staphylokinase nicht durch zusätzliche Dipetalin-Domänen beeinflusst.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass das Fusionsprotein H₆-Sak-Dip-I+II im Vergleich zu seinen Einzelkomponenten die gleiche Wirkung zeigte und deshalb die Bifunktionalität voll erhalten blieb. Damit stellt H₆-Sak-Dip-I+II einen kombinierten Wirkstoff dar, der für die Behandlung thromboembolischer Erkrankungen von Nutzen sein könnte.

7. Literaturverzeichnis

- 1 Anand SS:
The Organization to Assess Strategies for Ischemic Syndromes (OASIS) Pilot Study: Evaluation of acute and long-term therapies for patients with acute coronary syndromes without ST elevation.
Am J Cardiol **84** (1999) 13M-19M

- 2 Appel RD, Bairoch A & Hochstrasser DF:
A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW server.
Trends Biochem Sci **19** (1994) 258-60

- 3 Arocas V, Zingali RB, Guillin MC, Bon C & Jandrot-Perrus M:
Bothrojaracin: a potent two-site-directed thrombin inhibitor.
Biochemistry **35** (1996) 9083-9

- 4 Astrup T & Müllertz S:
The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity.
Arch Biochem Biophys **40** (1952) 346-51

- 5 Bang NU & Clayman MD:
Antithrombotic agents from salivary glands of hematophagous animals.
Trends Cardiovasc Med **2** (1992) 183-8

- 6 Bar-Shavit R, Hruska KA, Kahn AJ & Wilner GD:
Hormone-like activity of human thrombin.
Ann N Y Acad Sci **485** (1986) 335-48

- 7 Baykal D, Schmedtje JF, Jr. & Runge MS:
Role of the thrombin receptor in restenosis and atherosclerosis.
Am J Cardiol **75** (1995) 82B-87B

- 8 Beavis RC & Chait BT:
Matrix-assisted laser desorption ionization mass-spectrometry of proteins.
Methods Enzymol **270** (1996) 519-51

- 9 Behnke D & Gerlach D:
Cloning and expression in Escherichia coli, Bacillus subtilis, and Streptococcus sanguis of a gene for staphylokinase--a bacterial plasminogen activator.
Mol Gen Genet **210** (1987) 528-34

- 10 Bode W, Turk D & Karshikov A:
The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships.
Protein Sci **1** (1992) 426-71

- 11 Bode W & Huber R:
Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases.
Eur J Biochem **204** (1992) 433-51
- 12 Born GV:
Quantitative investigations into the aggregation of blood platelets.
J Physiol **162** (1962) 67-8
- 13 Bucha E, Markwardt F & Nowak G:
Hirudin in haemodialysis.
Thromb Res **60** (1990) 445-55
- 14 Christie R & Wilson H:
A test of staphylococcal fibrinolysis.
Aust J Exp Biol Med Sci **19** (1941) 329-32
- 15 Collen D:
On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski Memorial Lecture.
Thromb Haemost **43** (1980) 77-89
- 16 Collen D, Silence K, Demarsin E, De Mol E & Lijnen HR:
Isolation and characterization of natural and recombinant staphylokinase.
Fibrinolysis **6** (1992) 203-13
- 17 Collen D, Schlott B, Engelborghs Y, Van Hoef B, Hartmann M, Lijnen HR & Behnke D:
On the mechanism of the activation of human plasminogen by recombinant staphylokinase.
J Biol Chem **268** (1993) 8284-9
- 18 Collen D & Lijnen HR:
Molecular basis of fibrinolysis, as relevant for thrombolytic therapy.
Thromb Haemost **74** (1995) 167-71
- 19 Coughlin SR, Vu TK, Hung DT & Wheaton VI:
Expression cloning and characterization of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation.
Semin Thromb Hemost **18** (1992) 161-6
- 20 Deutsch DG & Mertz ET:
Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography.
Science **170** (1970) 1095-6
- 21 Dodt J, Müller HP, Seemüller U & Chang JY:
The complete amino acid sequence of hirudin, a thrombin specific inhibitor.
FEBS Lett **165** (1984) 180-4
- 22 Edman P:
Method for determination of the amino acid sequence in peptides.
Acta Chem Scand **4** (1950) 283-93

- 23 Eriksson BI, Ekman S, Kalebo P, Zachrisson B, Bach D & Close P:
Prevention of deep-vein thrombosis after total hip replacement: direct
thrombin inhibition with recombinant hirudin, CGP 39393.
Lancet **347** (1996) 635-9
- 24 Fareed J, Lewis BE, Callas DD, Hoppensteadt DA, Walenga JM & Bick RL:
Antithrombin agents: the new class of anticoagulant and antithrombotic
drugs.
Clin Appl Thromb Hemost **5 Suppl 1** (1999) S45-55
- 25 Flather MD, Weitz JI, Yusuf S, Pogue J, Sussex B, Campeau J, Gill J,
Schuld R, Joyner CD, Morris AL, Lai C, Theroux P, Marquis JF, Chan YK,
Venkatesh G & Jessel A:
Reactivation of coagulation after stopping infusions of recombinant hirudin
and unfractionated heparin in unstable angina and myocardial infarction
without ST elevation: results of a randomized trial. OASIS Pilot Study Inves-
tigators. Organization to Assess Strategies for Ischemic++ Syndromes.
Eur Heart J **21** (2000) 1473-81
- 26 Francischetti IM, Saliou B, Leduc M, Carlini CR, Hatmi M, Randon J, Faili A
& Bon C:
Convulxin, a potent platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus ter-
rificus* venom, specifically binds to platelets.
Toxicon **35** (1997) 1217-28
- 27 Friedrich T, Kroger B, Bialojan S, Lemaire HG, Hoffken HW, Reuschenbach
P, Otte M & Dodt J:
A Kazal-type inhibitor with thrombin specificity from *Rhodnius prolixus*.
J Biol Chem **268** (1993) 16216-22
- 28 Fuentes-Prior P, Noeske-Jungblut C, Donner P, Schleuning WD, Huber R &
Bode W:
Structure of the thrombin complex with triabin, a lipocalin-like exosite-
binding inhibitor derived from a triatomine bug.
Proc Natl Acad Sci U S A **94** (1997) 11845-50
- 29 Gallo R, Padurean A, Toschi V, Bichler J, Fallon JT, Chesebro JH, Fuster V
& Badimon JJ:
Prolonged thrombin inhibition reduces restenosis after balloon angioplasty
in porcine coronary arteries.
Circulation **97** (1998) 581-8
- 30 Gase A, Hartmann M, Gührs KH, Röcker A, Collen D, Behnke D & Schlott
B:
Functional significance of NH₂- and COOH-terminal regions of staphylo-
kinase in plasminogen activation.
Thromb Haemost **76** (1996) 755-60

- 31 Gerlach D, Kraft R & Behnke D:
Purification and characterization of the bacterial plasminogen activator staphylokinase secreted by a recombinant *Bacillus subtilis*.
Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A] **269** (1988) 314-22
- 32 Glusa E:
Hirudin and platelets.
Semin Thromb Hemost **17** (1991) 122-5.
- 33 Glusa E:
Vascular effects of thrombin.
Semin Thromb Hemost **18** (1992) 296-304
- 34 Glusa E & Paintz M:
Relaxant and contractile responses of porcine pulmonary arteries to a thrombin receptor activating peptide (TRAP).
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **349** (1994) 431-6.
- 35 Glusa E, Bretschneider E & Paintz M:
Contractile effects of thrombin in porcine pulmonary arteries and the influence of thrombin inhibitors.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **349** (1994) 101-6.
- 36 Glusa E, Bretschneider E, Daum J & Noeske-Jungblut C:
Inhibition of thrombin-mediated cellular effects by triabin, a highly potent anion-binding exosite thrombin inhibitor.
Thromb Haemost **77** (1997) 1196-200
- 37 Granger CB, Califf RM & Topol EJ:
Thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. A review.
Drugs **44** (1992) 293-325
- 38 Greinacher A, Volpel H, Janssens U, Hach-Wunderle V, Kemkes-Matthes B, Eichler P, Mueller-Velten HG & Potzsch B:
Recombinant hirudin (lepirudin) provides safe and effective anticoagulation in patients with heparin-induced thrombocytopenia: a prospective study.
Circulation **99** (1999) 73-80
- 39 Grutter MG, Priestle JP, Rahuel J, Grossenbacher H, Bode W, Hofsteenge J & Stone SR:
Crystal structure of the thrombin-hirudin complex: a novel mode of serine protease inhibition.
EMBO J **9** (1990) 2361-5
- 40 Gührs KH, Schlott B, Hartmann M, Vettermann S, Röcker A, Landmann H, Markwardt F & Schaub GA:
Neues Protein mit thrombinhemmender Wirkung aus der Raubwanze *Dipetalogaster maximus*.
Patent-Offenlegungsschrift **DE 19504776 A1** (1996)

- 41 Gültekin H & Heermann KH:
The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix.
Anal Biochem **172** (1988) 320-9
- 42 Hauptmann J, Gührs KH, Hartmann M & Schlott B:
The fibrinolytic activity of staphylokinase mutants in the fibrin plate assay.
Haemostasis **25** (1995) 272-6
- 43 Hauptmann J & Glusa E:
Differential effects of staphylokinase, streptokinase and tissue-type plasminogen activator on the lysis of retracted human plasma clots and fibrinolytic plasma parameters in vitro.
Blood Coagul Fibrinolysis **6** (1995) 579-83
- 44 Hauptmann J & Stürzebecher J:
Synthetic inhibitors of thrombin and factor Xa: from bench to bedside.
Thromb Res **93** (1999) 203-41
- 45 Heras M, Chesebro JH, Penny WJ, Bailey KR, Badimon L & Fuster V:
Effects of thrombin inhibition on the development of acute platelet-thrombus deposition during angioplasty in pigs. Heparin versus recombinant hirudin, a specific thrombin inhibitor.
Circulation **79** (1989) 657-65
- 46 Jandrot-Perrus M, Bouton MC, Lanza F & Guillin MC:
Thrombin interaction with platelet membrane glycoprotein Ib.
Semin Thromb Hemost **22** (1996) 151-6
- 47 Janknecht R, de Martynoff G, Lou J, Hipskind RA, Nordheim A & Stunnenberg HG:
Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus.
Proc Natl Acad Sci U S A **88** (1991) 8972-6.
- 48 Kaiser B, Fareed J, Hoppensteadt D, Birdsong B, Walenga JM & Markwardt F:
Influence of recombinant hirudin and unfractionated heparin on thrombin and factor Xa generation in extrinsic and intrinsic activated systems.
Thromb Res **65** (1992) 157-64
- 49 Kazal LA, Spicer DS & Brahinsky RA:
Isolation of a crystalline trypsin inhibitor-antikoagulant protein from pancreas.
J Am Chem Soc. **70** (1948) 3034-40
- 50 Koradi R, Billeter M & Wuthrich K:
MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures.
J Mol Graph **14** (1996) 51-5, 29-32

- 51 Kowalska-Loth B & Zakrzewski K:
The activation by staphylokinase of human plasminogen.
Acta Biochim Pol **22** (1975) 327-39
- 52 Kretschmann E & Raether H:
Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light.
Z. Naturforschung **23** (1968) 2135-6
- 53 Laemmli UK:
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature **227** (1970) 680-5
- 54 Lange U, Keilholz W, Schaub GA, Landmann H, Markwardt F & Nowak G:
Biochemical characterization of a thrombin inhibitor from the bloodsucking bug *Dipetalogaster maximus*.
Haemostasis **29** (1999) 204-11
- 55 Laskowski M, Jr. & Kato I:
Protein inhibitors of proteinases.
Annu Rev Biochem **49** (1980) 593-626
- 56 Lewis ML, Nachtwey DS & Damron KL:
A miniaturized fibrinolytic assay for plasminogen activators.
Thromb Res **64** (1991) 223-34.
- 57 Lijnen HR, Van Hoef B, Matsuo O & Collen D:
On the molecular interactions between plasminogen-staphylokinase, alpha 2-antiplasmin and fibrin.
Biochim Biophys Acta **1118** (1992) 144-8.
- 58 Markwardt F & Walsmann P:
Purification and analysis of the thrombin inhibitor hirudin.
Hoppe Seylers Z Physiol Chem **348** (1967) 1381-6.
- 59 Markwardt F, Walsmann P & Landmann H:
Inhibition of thrombin, plasmin and trypsin effect by alkyl- and alkoxybenzamidine.
Pharmazie **25** (1970) 551-4.
- 60 Markwardt F:
Coagulation inhibitors from blood-sucking animals. A new line of developing antithrombotic drugs.
Pharmazie **49** (1994a) 313-6
- 61 Markwardt F:
The development of hirudin as an antithrombotic drug.
Thromb Res **74** (1994b) 1-23

- 62 Markwardt F:
Coagulation inhibitors from animals feeding on blood.
Rev Iberoamer Tromb Hemostasia **7** (1994c) 225-31
- 63 Markwardt F:
Antithrombotic agents from hematophagous animals.
Clin Appl Thromb Hemost **2** (1996) 75-82
- 64 Martin PD, Robertson W, Turk D, Huber R, Bode W & Edwards BF:
The structure of residues 7-16 of the A alpha-chain of human fibrinogen bound to bovine thrombin at 2.3-A resolution.
J Biol Chem **267** (1992) 7911-20
- 65 Mende K, Petoukhova O, Koulitchkova VV, Schaub GA, Lange U, Kaufmann R & Nowak G:
Dipetalogastin, a potent thrombin inhibitor from the blood-sucking insect *Dipetalogaster maximus* cDNA cloning, expression and characterization.
Eur J Biochem **266** (1999) 583-90
- 66 Merlini PA, Ardissino D, Bauer KA, Oltrona L, Spinola A, Diotallevi P, Rosenberg RD & Mannucci PM:
Activation of the hemostatic mechanism during thrombolysis in patients with unstable angina pectoris.
Blood **86** (1995) 3327-32
- 67 Morrison JF & Stone SR:
Approaches to the study and analysis of the inhibition of enzymes by slow- and tight-binding inhibitors.
Comments Mol Cell Biophys **2** (1985) 347-68
- 68 Naski MC, Fenton JW, 2nd, Maraganore JM, Olson ST & Shafer JA:
The COOH-terminal domain of hirudin. An exosite-directed competitive inhibitor of the action of alpha-thrombin on fibrinogen.
J Biol Chem **265** (1990) 13484-9.
- 69 Noeske-Jungblut C, Krätzschar J, Haendler B, Alagon A, Possani L, Verhallen P, Donner P & Schleuning WD:
An inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*.
J Biol Chem **269** (1994) 5050-3
- 70 Noeske-Jungblut C, Haendler B, Donner P, Alagon A, Possani L & Schleuning WD:
Triabin, a highly potent exosite inhibitor of thrombin.
J Biol Chem **270** (1995) 28629-34
- 71 Nowak G, Lange U, Mende K & Bucha E:
Thrombininhibitoren aus blutsaugenden Tieren.
Nova Acta Leopoldina NF **80** **311** (1999) 37-59

- 72 Ohlenschläger O, Ramachandran R, Flemming J, Gührs KH, Schlott B & Brown LR:
NMR secondary structure of the plasminogen activator protein staphylokinase.
J Biomol NMR **9** (1997) 273-86
- 73 Ohlenschläger O, Ramachandran R, Gührs KH, Schlott B & Brown LR:
Nuclear magnetic resonance solution structure of the plasminogen-activator protein staphylokinase.
Biochemistry **37** (1998) 10635-42
- 74 Ohman EM, Califf RM, Topol EJ, Candela R, Abbottsmith C, Ellis S, Sigmon KN, Kereiakes D, George B & Stack R:
Consequences of reocclusion after successful reperfusion therapy in acute myocardial infarction. TAMI Study Group.
Circulation **82** (1990) 781-91
- 75 Parry MA, Fernandez-Catalan C, Bergner A, Huber R, Hopfner KP, Schlott B, Gührs KH & Bode W:
The ternary microplasmin-staphylokinase-microplasmin complex is a proteinase-cofactor-substrate complex in action.
Nat Struct Biol **5** (1998) 917-23
- 76 Phaneuf MD, Ozaki CK, Johnstone MT, Loza JP, Quist WC & LoGerfo FW:
Covalent linkage of streptokinase to recombinant hirudin: a novel thrombolytic agent with antithrombotic properties.
Thromb Haemost **71** (1994) 481-7
- 77 Richardson JL, Kroger B, Hoeffken W, Sadler JE, Pereira P, Huber R, Bode W & Fuentes-Prior P:
Crystal structure of the human alpha-thrombin-haemadin complex: an exosite II-binding inhibitor.
EMBO J **19** (2000) 5650-60
- 78 Rübsamen K & Eschenfelder V:
Effect of recombinant hirudin (LU 52369) on reocclusion rates after thrombolysis in rabbits.
Haemostasis **21 Suppl 1** (1991) 93-8
- 79 Rydel TJ, Ravichandran KG, Tulinsky A, Bode W, Huber R, Roitsch C & Fenton JW, 2nd:
The structure of a complex of recombinant hirudin and human alpha-thrombin.
Science **249** (1990) 277-80.
- 80 Sako T, Sawaki S, Sakurai T, Ito S, Yoshizawa Y & Kondo I:
Cloning and expression of the staphylokinase gene of *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli*.
Mol Gen Genet **190** (1983) 271-7

- 81 Sako T:
Overproduction of staphylokinase in *Escherichia coli* and its characterization.
Eur J Biochem **149** (1985) 557-63
- 82 Schlott B, Hartmann M, Gührs KH, Birch-Hirschfeld E, Gase A, Vettermann S, Collen D & Lijnen HR:
Functional properties of recombinant staphylokinase variants obtained by site-specific mutagenesis of methionine-26.
Biochim Biophys Acta **1204** (1994a) 235-42
- 83 Schlott B, Hartmann M, Gührs KH, Birch-Hirschfeld E, Pohl HD, Vanderschueren S, Van de Werf F, Michoel A, Collen D & Behnke D:
High yield production and purification of recombinant staphylokinase for thrombolytic therapy.
Biotechnology (N Y) **12** (1994b) 185-9
- 84 Schlott B, Gührs KH, Hartmann M, Röcker A & Collen D:
Staphylokinase requires NH₂-terminal proteolysis for plasminogen activation.
J Biol Chem **272** (1997) 6067-72
- 85 Schlott B, Gührs KH, Hartmann M, Röcker A & Collen D:
NH₂-terminal structural motifs in staphylokinase required for plasminogen activation.
J Biol Chem **273** (1998) 22346-50
- 86 Schlott B, Wöhnert J, Icke C, Hartmann M, Ramachandran R, Gührs KH, Glusa E, Flemming J, Görlach M, Große F & Ohlenschläger O:
Interaction of Kazal-type inhibitor domains with serine proteinases: Biochemical and structural studies.
J Mol Biol (in Druck)
- 87 Schwartz SM, Reidy MA & O'Brien ER:
Assessment of factors important in atherosclerotic occlusion and restenosis.
Thromb Haemost **74** (1995) 541-51
- 88 Silence K, Hartmann M, Gührs KH, Gase A, Schlott B, Collen D & Lijnen HR:
Structure-function relationships in staphylokinase as revealed by "clustered charge to alanine" mutagenesis.
J Biol Chem **270** (1995) 27192-8
- 89 Stone SR & Hofsteenge J:
Kinetics of the inhibition of thrombin by hirudin.
Biochemistry **25** (1986) 4622-8

- 90 Stone SR & Tapparelli C:
Thrombin inhibitors as antithrombotic agents: the importance of rapid inhibition.
J Enzyme Inhib **9** (1995) 3-15
- 91 Strube KH, Kröger B, Bialojan S, Otte M & Dodt J:
Isolation, sequence analysis, and cloning of haemadin. An anticoagulant peptide from the Indian leech.
J Biol Chem **268** (1993) 8590-5
- 92 Szarka SJ, Sihota EG, Habibi HR & Wong S:
Staphylokinase as a plasminogen activator component in recombinant fusion proteins.
Appl Environ Microbiol **65** (1999) 506-13.
- 93 Szemraj J, Chabielska E, Kawecka I, Janiszewska G, Buczek W & Pietrucha T:
New recombinant thrombolytic and antithrombotic agents: Chimeric staphylokinase activators K2/STA/HIR and RGD/K2/STA/HIR.
Thromb Hemost **Suppl** (2001) P438
- 94 Turpie AG, Weitz JI & Hirsh J:
Advances in antithrombotic therapy: novel agents.
Thromb Haemost **74** (1995) 565-71
- 95 van de Locht A, Lamba D, Bauer M, Huber R, Friedrich T, Kroger B, Hoffken W & Bode W:
Two heads are better than one: crystal structure of the insect derived double domain Kazal inhibitor rhodniin in complex with thrombin.
EMBO J **14** (1995) 5149-57
- 96 van de Locht A, Stubbs MT, Bauer M & Bode W:
Crystallographic evidence that the F2 kringle catalytic domain linker of prothrombin does not cover the fibrinogen recognition exosite.
J Biol Chem **271** (1996) 3413-6
- 97 van Zyl WB, Pretorius GH, Hartmann M & Kotze HF:
Production of a recombinant antithrombotic and fibrinolytic protein, PLATSAK, in *Escherichia coli*.
Thromb Res **88** (1997) 419-26.
- 98 Vanderschueren S, Barrios L, Kerdinchai P, Van den Heuvel P, Hermans L, Vrolix M, De Man F, Benit E, Muyldermans L, Collen D & et al.:
A randomized trial of recombinant staphylokinase versus alteplase for coronary artery patency in acute myocardial infarction. The STAR Trial Group.
Circulation **92** (1995) 2044-9.

- 99 Walenga JM, Bakhos M, Messmore HL, Koza M, Wallock M, Orfei E, Fareed J & Pifarre R:
Comparison of recombinant hirudin and heparin as an anticoagulant in a cardiopulmonary bypass model.
Blood Coagul Fibrinolysis **2** (1991) 105-11
- 100 Weitz JI:
Activation of blood coagulation by plaque rupture: mechanisms and prevention.
Am J Cardiol **75** (1995) 18B-22B
- 101 Ye J, Rezaie AR & Esmon CT:
Glycosaminoglycan contributions to both protein C activation and thrombin inhibition involve a common arginine-rich site in thrombin that includes residues arginine 93, 97, and 101.
J Biol Chem **269** (1994) 17965-70

8. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben:

Frau Prof. Dr. Erika Glusa, FSU Jena (Erfurt)

Herr Dr. Bernhard Schlott, IMB Jena,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe,

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 08.01.2002

9. Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist Bestandteil eines von der DFG geförderten Projektes unter Kooperation des Zentrums für Vaskuläre Biologie und Medizin der Friedrich-Schiller-Universität in Erfurt mit dem Institut für Molekulare Biotechnologie Jena.

Mein außerordentlicher Dank gilt meinen Betreuern Frau Professor Dr. Erika Glusa und Herrn Dr. Bernhard Schlott. Beide haben, jeder in seinem Fachgebiet, maßgeblichen Anteil an der Entstehung dieser Arbeit durch ihre hilfsbereite und gewissenhafte Unterstützung, zahlreiche experimentelle Anregungen, die Beratung während der Anfertigung der Dissertation und die ausführliche und kritische Durchsicht des Manuskriptes. Frau Professor Glusa danke ich für die Vergabe des Themas. Ebenso gilt mein Dank Herrn Professor Dr. Frank Große für die Möglichkeit, am IMB Jena zu arbeiten.

Herrn Dr. Manfred Hartmann danke ich vielmals für die genetischen Arbeiten zur Konstruktion der Fusionsproteine, welche die stoffliche Grundlage dieser Arbeit bildeten.

Frau Birgit Pohle danke ich für die freundliche und ausdauernde Begleitung während erster unsicherer Schritte im Labor, die exzellente Einführung in die Proteinreinigung und die praktische Unterstützung in den biochemischen Arbeitsphasen. Frau Ingrid Wagner, Heide Stolze und Anita Willitzer danke ich für die hilfsbereite Unterstützung bei der technischen Durchführung der Experimente.

Bei Dr. Karl-Heinz Gührs möchte ich mich für die Hilfe bei proteinbiochemischen Fragestellungen und für Rettungsmaßnahmen am Computer bedanken. Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Oliver Ohlenschläger für das Interesse am Fortgang der Arbeit, die hilfreiche Beratung während der Dissertation und Hilfestellung beim Erstellen der Publikationen.

Allen Mitgliedern der Abteilungen Biochemie des IMB Jena und Vaskuläre Biologie und Medizin der FSU Jena danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung sowie für die freundliche Arbeitsatmosphäre.

10. Lebenslauf

Name: Christian Icke
 Wohnort: Bonifaciusstr. 11, 99084 Erfurt
 Geburtstag und –ort: 06.04.1973 in Erfurt
 Familienstand: ledig, keine Kinder
 Nationalität: deutsch

Schulbildung:

1979 – 1989	Polytechnische Oberschule Erfurt
1989 – 1991	Erweiterte Oberschule Erfurt
27.06.1991	Abitur

Zivildienst:

1992 – 1993	Medizinische Hochschule Erfurt
-------------	--------------------------------

Studium:

1993 – 2000	Medizinische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena
20.06.2000	Abschluss des Studiums, Teilapprobation als Arzt im Praktikum

Berufspraxis:

1991 – 1992	Pflegerische Hilfskraft in der Zentralklinik Bad Berka
seit 07/2000	Wissenschaftlicher Assistent im Zentrum für Vaskuläre Biologie und Medizin Erfurt

Jena, den 08.01.2002
